

Aufreinigung und Charakterisierung des Apoptose auslösenden Faktors aus *Helicobacter pylori*

Dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaft
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Diplom Biochem.
Silke Schütz

geboren am 13.03.1973 in Bad Oeynhausen

2002

**Aufreinigung und Charakterisierung des Apoptose auslösenden Faktors
aus *Helicobacter pylori***

Dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von

Diplom Biochem.
Silke Schütz

geboren am 13.03.1973 in Bad Oeynhausen

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Winfried Beil im Zeitraum vom 01. 01. 2001 bis zum 21. 10. 2002 angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Walter Müller

Abteilung Physiologische Chemie

Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Winfried Beil

Institut für Allgemeine Pharmakologie

Institut für Allgemeine Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 17. 12. 2002

Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* geht mit einem erhöhten programmierten Zelltod in Magenepithelzellen einher und spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Ulkuserkrankungen. Die Apoptose auslösenden Faktoren sind jedoch nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Apoptose induzierende Protein mittels Ammoniumsulfat- und Hitzefällung und durch Hydroxylapatit- und hydrophobe Interaktions-Chromatographie 400fach angereichert. Die gelelektrophoretische Auftrennung apoptotisch aktiver Fraktionen zeigte eine Proteinbande bei 60 kDa, die in sequenzanalytischen Untersuchungen als das Hitzeschockprotein HSP60 identifiziert wurde. Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen HSP60 konnte die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose um bis zu 60 % inhibiert werden. Die Hemmung des programmierten Zelltods wurde durch Messung der DNA-Fragmentierung im Histon-Elisa nachgewiesen. Die ATPase-Aktivität des aufgereinigten *H. pylori*-Sonikats, die in enzymatischen Messungen durch einwertige Kationen in der Reihenfolge $\text{NH}_4^+ = \text{Na}^+ \ll \text{K}^+$ stimulierbar war, wurde durch die selektiven Na^+/K^+ - und H^+/K^+ -Inhibitoren Ouabain und Schering 28080 um ca. 50 % gehemmt. Es muß sich daher um eine chimäre ATPase handeln, die durch beide ATPase-Hemmstoffe inhibierbar war. Weiterhin konnte der keim ausgelöste programmierte Zelltod in den Magenepithelzellen durch die Koinkubation mit den ATPase-Inhibitoren gehemmt werden. Ouabain reduzierte das Ausmaß der Apoptose vollständig, während Schering 28080 die Apoptoserate um 70 % im Vergleich zum Sonikat inhibierte. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß die ATPase-Untereinheit des HSP60 an der *Helicobacter pylori*-induzierten Apoptose beteiligt ist und somit auch in der Pathogenese der Ulkuserkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

Schlagworte: *Helicobacter pylori*, Apoptose, Hitzeschockproteine

Abstract

Helicobacter pylori-infection is accompanied by gastric epithelial cell death and plays an important role in the pathogenesis of peptic ulcer diseases. The responsible factors for the induction of apoptosis are unknown. In this study the apoptosis inducing protein from *H. pylori* was purified 400fold by ammoniumsulphate- and heatprecipitation and further by hydroxylapatite- and hydrophobic interactionchromatography. The aminoterminal sequence of the protein migrating as a band at 60 kDa by SDS-gelelectrophoresis corresponded to the heat shock protein HSP60. The apoptosis-inducing activity of *Helicobacter pylori* measured by Histon Elisa was inhibited up to 60 % by a monoclonal antibody. ATPase-activity in purified *H. pylori*-sonicate was stimulated by monovalent kations in the following order $\text{NH}_4^+ = \text{Na}^+ \ll \text{K}^+$ and was inhibited up to 50 % by the selective Na^+/K^+ - and H^+/K^+ -ATPase-inhibitors Ouabain und Schering 28080, indicating a chimeric ATPase which was sensitive to both ATPase-inhibitors. Furthermore *H. p.*-induced apoptosis in gastric epithelial cells could be inhibited by both ATPase-inhibitors. Ouabain completely abolished apoptosis whereas Schering 28080 inhibited cell death up to 70 % regarded to the sonicate. These results indicate that the ATPase-domain of HSP60 is involved in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis and therefore plays an impotant role in peptic ulcer diseases.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Apoptosis, Heat shock proteins

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Bakterium <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2	<i>Helicobacter pylori</i> -assoziierte Krankheiten.....	3
1.3	<i>Helicobacter pylori</i> und Apoptose	5
1.4	Der Zelltod.....	6
1.5	Der apoptotische Signalweg in der Zelle.....	7
1.6	Ziel dieser Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Zelllinie	11
2.1.2	Bakterien-Stämme.....	11
2.1.3	Geräte	11
2.1.4	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Puffer und Lösungen.....	17
2.2.2	<i>Helicobacter pylori</i>	25
2.2.2.1	<i>Helicobacter pylori</i> -Kultur und Stammhaltung.....	25
2.2.2.2	Herstellung eines <i>Helicobacter-pylori</i> -Sonikates.....	25
2.2.3	Magenzellinie AGS	25
2.2.3.1	Kultur der Magenzelllinien.....	25
2.2.3.2	Einfrieren von Magenzellen	26
2.2.3.3	Aussaat von Zellen für Kulturexperimente	26
2.2.4	Methoden zur Proteinfällung.....	26
2.2.4.1	Ammoniumsulfatpräzipitation.....	26
2.2.4.2	Präzipitation durch Erhitzen	27
2.2.4.3	Präzipitation durch organische Lösungsmittel	27
2.2.4.4	Präzipitation durch Polyethylenglycol.....	28
2.2.5	Einfluß des pH-Wertes.....	28
2.2.6	Flüssigkeitschromatographische Trennverfahren.....	28
2.2.6.1	Gelfiltration	28
2.2.6.2	Hydroxylapatit	29
2.2.6.3	Hydrophobizitätschromatographie	30
2.2.7	LPS-Extraktion aus <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.2.8	Extraktion von Sphingomyelinasen aus <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.2.9	Ureasetest	32
2.2.10	Bestimmung der Apoptoserate.....	32
2.2.11	Proteinfällung nach Wessel und Flügge.....	33
2.2.12	Gelelektrophoretische Auftrennung.....	34
2.2.12.1	SDS-Gelelektrophorese	34
2.2.12.2	BN-Gelelektrophorese	34
2.2.13	Färbung und Trocknung der Gele	35
2.2.13.1	Färbung mit Coomassie	35
2.2.13.2	Trocknen der Gele	36
2.2.14	Elektroelution der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine	36
2.2.15	Western-Blotting der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine.....	36
2.2.16	Protein-Sequenzierung	37
2.2.17	Antikörperinkubation.....	38
2.2.18	Detektion.....	38

2.2.19	ATPase-Assay	39
2.2.20	LDH-Zytotoxizitäts-Assay.....	39
2.2.21	Proteinbestimmung nach Bradford	40
2.2.22	Statistische Auswertung der Meßergebnisse	40
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Wirkung von <i>Helicobacter pylori</i> -Sonikat auf die Apoptoserate von AGS-Zellen	41
3.2	Vergleich der Wirkung von <i>Helicobacter pylori</i> -Sonikaten verschiedener Mutanten auf die Apoptoserate von AGS-Zellen.....	43
3.3	Ammoniumsulfatfällung des <i>Helicobacter pylori</i> -Sonikates	44
3.4	Hitzegefällung des <i>Helicobacter pylori</i> -Sonikats	45
3.5	Fällung des <i>H. p.</i> -Sonikats durch organische Lösungsmittel	46
3.6	Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität des Apoptose-Faktors von <i>Helicobacter pylori</i>	47
3.7	Fällung des <i>H. p.</i> -Sonikats durch Polyethylenglycol	48
3.8	Bestimmung der molekularen Masse des Apoptose induzierenden Faktors von <i>Helicobacter pylori</i> durch Ausschlußchromatographie	49
3.9	Verteilung der apoptotischen Aktivität von <i>Helicobacter pylori</i> nach Aufreinigung über Hydrophobizitäts-Chromatographie	53
3.10	Verteilung der apoptotischen Aktivität von <i>Helicobacter pylori</i> nach Aufreinigung über Hydroxylapatit	54
3.11	Urease-Aktivitätsbestimmung	55
3.12	Wirkung von Ammoniak und <i>Helicobacter pylori</i> -Sonikat in Verbindung mit Harnstoff auf die Apoptoserate von AGS-Zellen	57
3.13	Extraktion von <i>Helicobacter pylori</i> -LPS.....	58
3.14	Extraktion von <i>Helicobacter pylori</i> -Sphingomyelinasen	59
3.15	Gelelektrophoretische Auftrennung der <i>Helicobacter pylori</i> -Proteine	60
3.15.1	Auftrennung durch denaturierende Gelelektrophorese.....	61
3.15.2	Auftrennung durch native Gelelektrophorese.....	62
3.16	Proteinsequenzierung.....	63
3.17	Wirkung von HSP60-Antikörper auf die <i>Helicobacter pylori</i> -induzierte Apoptose in AGS-Zellen.....	64
3.18	Einfluß eines Hitzeschocks auf das Expressionsmuster von HSP60 in <i>Helicobacter pylori</i>	65
3.19	ATPase-Klassifizierung im <i>Helicobacter pylori</i> -Sonikat.....	66
3.20	Wirkung von ATPase-Hemmstoffen auf die <i>Helicobacter pylori</i> -induzierte Apoptose in AGS-Zellen	67
3.21	Wirkung von Dextransulfat auf die <i>Helicobacter pylori</i> -induzierte Apoptose in AGS-Zellen.....	69
3.22	Wirkung von Ca ²⁺ -Kanalblockern auf die <i>Helicobacter pylori</i> -induzierte Apoptose in AGS-Zellen.....	70
4	DISKUSSION.....	72
4.1	<i>Helicobacter pylori</i> und Apoptose	72
4.2	Rolle von VacA und CagA in der Apoptoseinduktion	73
4.3	Lipopolysaccharide.....	75
4.4	Urease	76
4.5	Hitzeschockproteine	79
4.6	ATPasen.....	83
4.7	Rezeptoren für Hitzeschockprotein HSP60.....	85
4.8	Sphingomyelinasen.....	87

5	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6	LITERATURVERZEICHNIS	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat(6)]
AIDS	Erworbenes Immunabwehrdefizienz-Syndrom (acquired immunodeficiency syndrom)
AK	Antikörper
Apaf-1	Apoptoseprotease aktivierender Faktor (apoptotic protease-activation factor)
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BHI	Brain-Heart Infusion Broth
BN	Blue Native
BSA	Rinderserumalbumin
CagA	Zytotoxin assoziiertes Antigen
CARD	Caspase rekrutierende Domäne (caspase recuitment domain)
DD	Todesdomäne (death domain)
DED	Todeseffektor-Domäne (death effector domain)
DISC	Todesinduzierender Signalkomplex (death-inducing signaling complex)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dextransulfat
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extrazellulär regulierte Kinase (mitogen-aktivierte Proteinkinase)
Fa.	Firma
FADD	Fas-assoziiertes Todesdomänenprotein (Fas-associated death domain)
FCS	Fötales Kälberserum
FAN	neutrale SMase-aktivierender Faktor (factor activating NSMase)
FPLC	Schnellauflösende Flüssigkeitschromatographie (fast performance liquid chromatographie)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s)
Gg3	Gangliotriaosylceramid
Gg4	Gangliotetraosylceramid

h	Stunde
HAP	Hydroxylapatit
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
<i>H. p.</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HRP	horseradish peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-Phenyltetrazolium-chlorid
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kbp	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysacchride
NSAID	nichtsteroidale Antiphlogistika
M	molar (mol/l)
MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAP	mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NAP	neutrophil-activating protein
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
NSD	neutrale SMase aktivierende Domäne (NSMase activating domain)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
Pi	Phosphat
PITC	Phenylisothiocyanat
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell-Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAPK	streßaktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler der Mittelwerts
SGC	Sulfogalactosylceramid
SMase	Sphingomyelinase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR	toll like receptor
TMB8	8-(Diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoat
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminoethan
U	Units
U1 snRNP	U1 small nuclear ribonucleoprotein protein
Uz	Ultrazentrifugation
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin
v/v	Volumen/Volumen
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das Bakterium *Helicobacter pylori*

Das gramnegative, mikroaerophile Bakterium *Helicobacter pylori* besiedelt den Raum zwischen Mukus und Magenepithel (Hazell et al., 1986). Es ist dabei vermehrt in den Intrazellularspalten von Mukuszellen in der Nähe der tight junctions und in den sekretorischen Caniculi, nicht jedoch innerhalb der Epithelzellen anzutreffen. Die vom Keim bevorzugte Region des Magens stellt das Antrum dar, aber auch Korpus und Fundus werden von *Helicobacter pylori* besiedelt (Wyatt und Gray, 1992).

In Kultur tritt das Bakterium in der Regel als spiralförmiger Organismus mit einem Durchmesser von 0,5-0,9 µm und einer Länge von 2-4 µm auf. Das gesamte Bakterium ist mit einer polysaccharidreichen Hülle umgeben. Diese erstreckt sich auch auf ein Bündel von 3-6 Flagellen, die an einem der Zellpole lokalisiert sind und dem Bakterium eine hohe Beweglichkeit verleihen.

Ein optimales Wachstum von *Helicobacter pylori* in Kultur wird unter mikroaeroben Bedingungen erzielt. Das Bakterium benötigt reichhaltige Nährböden zum Wachsen, die in der Regel mit Säugerblut angereichert sind. In vivo dienen Substanzen des Wirtsorganismus als Nährstoffe. Bei längerer Bebrütung, in Anwesenheit von Antibiotika oder bei Aufbewahrung in Wasser, geht das Bakterium von einer spiralförmigen in eine Kokkoid-Form über, die auch als Ruheform betrachtet werden kann (Cellini et al., 1994).

Das Genom des Bakterium ist mit 1,7 Mio Basenpaaren relativ klein (Bukanov und Berg, 1994). Dies korrespondiert mit den hohen Nährstoffansprüchen des Keims. Etwa 50 % der Stämme tragen Plasmide, deren Funktion jedoch nicht geklärt ist (Taylor 1991).

Schlüsselreaktionen für die Identifizierung des Keims sind positive Katalase- und Oxidasereaktionen sowie die Bildung großer Mengen Urease, die als ein essentieller Faktor für die Kolonisation und Persistenz des Keims im Magen identifiziert wurde. Die Urease, ein 550 kDa-Protein, stellt ca. 6 % des bakteriellen Proteins dar (Ferrero und Lee, 1991). Eine wichtige Funktion des Enzyms besteht in der Spaltung geringer Mengen Harnstoff, die im Magen vorkommen. Durch diesen Vorgang ist das Bakterium von einer Ammoniakwolke umgeben, die die Magensäure neutralisiert. Eine zweite Funktion der Urease könnte in der Bereitstellung von Ammoniak als Stickstoffquelle für die Synthese von Aminosäuren bestehen, da *Helicobacter pylori* über entsprechende Enzyme verfügt, die den freigesetzten

Ammoniak verwerten können (Williams et al., 1996). Weitere, im Moment noch diskutierte Funktionen der Urease sind eine zytotoxische Wirkung (die bei der Reaktion von Ammoniak mit Wasser entstehenden Hydroxylionen sind für Epithelzellen toxisch) und immunmodulatorische Funktionen (Smoot et al., 1990).

Eine weitere Voraussetzung für die Besiedlung des Magens stellt die hohe Motilität von *H. pylori* dar, die durch Flagellen des Keims gewährleistet wird. Sie ermöglichen es dem Bakterium, sich im viskösen Mukus der Magenschleimhaut zu bewegen und die Epithelschicht zu erreichen (Hazell et al., 1986) und sind sowohl für die Kolonisierung als auch für die Persistenz im Magen von entscheidender Bedeutung (Geis et al., 1989). Die Geißeln sind von einer membranartigen Flagellenhülle umgeben, welche ein besonders charakteristisches morphologisches Merkmal dieses Erregers ist (Geis et al., 1993) und wahrscheinlich die säurelabilen Filamente der Flagellen vor der Säureeinwirkung des Magens (Leying et al., 1992) schützt. Zusätzlich kann ein Teil der Bakterien durch die Bildung von Adhäsinen mit Magenepithelzellen über spezifische Bindung an Rezeptoren in engen Kontakt treten. Dabei bilden die Magenepithelzellen podestartige Zellfortsätze aus, die einen engen Kontakt des Keims an die Zellen ermöglichen (Segal et al., 1996).

Abgesehen von diesen für die Kolonisierung wichtigen Voraussetzungen weist der Keim weitere Eigenschaften auf, die es ihm ermöglichen, im Magen zu persistieren. So besitzt das Bakterium eine hohe Superoxiddismutase- und Katalaseaktivität (Hazell et al., 1991; Spiegelhalder et al., 1993). Diese dienen wahrscheinlich zur Entgiftung von Superoxid-Anionen, die von neutrophilen Granulocyten während der Immunabwehr produziert werden. Zusätzlich zu den Kolonisations- und Persistenzfaktoren weist *Helicobacter pylori* verschiedene gewebsschädigende Faktoren auf. Einen wichtigen Virulenzfaktor stellt das vakuolisierende Zytotoxin VacA dar, das Störungen der intrazellulären Membranumbauvorgänge hervorruft und für die Entstehung von Schleimhautläsionen verantwortlich ist (Papini et al., 1994). Das VacA-Toxin, dessen Gen in allen *H.p.*-Stämmen nachweisbar ist, ist ein 87-kDa-Protein, das durch einen aktiven Mechanismus aus der Bakterienzelle in das umgebende Milieu sezerniert wird und hochgradig resistent gegen Verdauung durch Pepsin und Säure ist. Die Produktion des Zytotoxins korreliert statistisch mit dem Vorhandensein des 128-kDa-Proteins CagA (Covacci et al., 1993), jedoch ist *cagA*, das Gen, das für dieses Protein kodiert, nicht in allen Stämmen vorhanden. Stämme, die sowohl VacA als auch CagA exprimieren, werden als Typ I-Stämme, die andere Gruppe als Typ II-Stämme klassifiziert.

Typ I-Stämme sind wesentlich häufiger mit Ulkuskrankheiten assoziiert als Typ II-Stämme (Xiang et al., 1995).

Weiterhin werden als gewebsschädigende Faktoren noch bakterielle Lipopolysaccharide beschrieben, die wichtige Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien darstellen und eine stark vermehrte Freisetzung von Pepsinogen aus den Magen­zellen induzieren (Moran, 1995). Somit tragen *H.p.*-LPS zu Schleimhautläsionen bei und erhöhen das Ulkusrisiko. Auch Proteasen, Phospholipasen A und C sowie Alkoholdehydrogenasen werden eine Rolle bei der Schädigung von Mukus- und Epithelzellen zugesprochen.

1.2 *Helicobacter pylori*-assoziierte Krankheiten

Die *H.-p.*-induzierte B-Gastritis stellt mit 80 – 90 % aller Gastritiden die häufigste Gastritisform dar. Fünfundneunzig Prozent aller Ulkus duodeni und ca. 80 % der Ulkus ventriculi gelten als Folgeleiden der durch den Keim verursachten Gastritis (Saperas et al., 1990). Neben der Dichte der Keimkolonisation bestimmen exogene Faktoren wie Vitamin-C-Mangel und erhöhter Salzgehalt den Grad der Schleimhautschädigung.

Die *Helicobacter pylori*-Infektion der Magenschleimhaut kann als sogenannte „slow bacterial infection“ bezeichnet werden, wobei der pathogene Effekt zum einen durch keimeigene Virulenzfaktoren, zum anderen durch die Immunantwort des Wirtes hervorgerufen wird.

Die Primärantwort auf die Kolonisation durch den Keim stellt eine Infiltration der Mukosa durch Neutrophile, Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen dar. Diese wird sowohl durch bakterielle Faktoren als auch durch Induktion von Interleukin-8 und anderen Zytokinen der Entzündungskaskade hervorgerufen (Crabtree et al., 1994). Hierbei existieren stammspezifische Unterschiede. Stämme vom Typ I ($VacA^+/CagA^+$) stimulieren vermehrt die Sekretion von IL-8 in Magenepithelzellen während bei der Infektion mit Stämmen vom Typ II nur eine geringe IL-8-Sekretion erfolgt (Crabtree et al., 1994).

TNF α und IL-1 werden durch Transkriptionsfaktoren aktiviert, die bei der Gastritis in der Magenschleimhaut gebildet werden (Crabtree et al., 1991). In der akuten Infektionsphase werden die Aufnahme bakterieller Produkte und die Induktion der Zytokinsekretion von Makrophagen der Mukosa durch die Infiltration mit Neutrophilen und die Schädigung der Magenschleimhaut durch das vakuolisierende Zytotoxin begünstigt (Tufano et al., 1994). Sind Neutrophile am Infektionsort eingetroffen, sind sie selbst Quellen von entzündungsfördernden

Zytokinen wie IL-1 und TNF- α und stimulieren dadurch die zelluläre Immunantwort auf die Infektion.

Der akuten Gastritis, die eine unmittelbare Antwort auf die Freisetzung von Antigenen des Keims darstellt, folgt häufig eine chronische Gastritis mit persistierender *Helicobacter pylori*-Infektion. Alle Patienten mit einer chronischen Gastritis reagieren mit der Bildung von spezifischem, mukosomalem IgA und IgG auf die Infektion mit *H. pylori* (Crabtree et al., 1991), die für die Inhibition der Antigenaufnahme, die Verhinderung der bakteriellen Adhäsion und für die Toxin-Neutralisation wichtig zu sein scheinen.

Ca. 30 % der mit *Helicobacter pylori* infizierten Patienten entwickeln als Folgeleiden einen Ulkus duodeni oder ventriculi. Als Voraussetzung für die Bildung eines Ulkus gelten Schädigungen der Mukosa durch Medikamente, wie z. B. NSAID oder *Helicobacter pylori*, durch die eine Rückdiffusion von Magensäure in das Epithel erfolgen kann. Exogene Noxen können hierbei die Ulkuserstehung fördern. Das Risiko, an einem Ulkus zu erkranken, ist bei *Helicobacter pylori*-Infektion 4fach erhöht. Entscheidend für die Intensität der Ulkuserkrankung scheint der Keimstatus zu sein, da Stämme vom Typ I vermehrt in Ulkus-Patienten angetroffen werden. Für das Ulkus duodeni ist zunächst die Bildung von Magenoberflächenepithel als Reaktion auf Darmschleimhauterosionen durch einen Überschuß an Magensäure Voraussetzung. Diese Regionen gastraler Metaplasie können im folgenden von *Helicobacter pylori* besiedelt werden.

Auch für das MALT-Lymphom des Magens sind Zusammenhänge zwischen H.-pylori-Infektion und dem Auftreten des Lymphoms gezeigt worden. Als Folge der Keiminfection entstehen zunehmend lymphozytäre Aggregate in der Magenschleimhaut (Hauke et al., 1990). Die Häufigkeit der Lymphfollikel steigt dabei mit dem Grad der *Helicobacter pylori*-Gastritis an (Eidt und Stolte, 1993). Diese Follikel können in der Folge die Basis für ein malignes Lymphom sein.

Weiterhin gibt es Hinweise dafür, daß das Bakterium einen Auslöser des Magenkarzinoms darstellt. Durch den Verlust von säureproduzierenden Zellen (Hypochlorhydrie) und einem nachfolgend erhöhten pH-Wert des Magens kann primär eine Etablierung und Ausbreitung des Keims im Magen begünstigt werden, und es sekundär zu einer dauerhaften Besiedlung des Organs durch Bakterien kommen, die durch die Produktion von Nitrit zur Bildung von mutagenen N-Nitrosoverbindungen beitragen.

Der Wirtsorganismus reagiert auf die *Helicobacter pylori*-Infektion mit einer Infiltration des Magenepithels durch neutrophile Granulocyten. Deren Reaktionsprodukte, die freien Sauerstoffradikale, können auf die DNA der Magenzellen mutagen wirken (Halliwell und Aruoma, 1991). Die gleichzeitige Senkung des Ascorbatspiegels während einer Gastritis (Banerjee et al., 1994) würde aufgrund des Fehlens eines wichtigen Radikalfängers diesen Effekt noch verstärken. Ebenso würde eine weitere wichtige Funktion des Ascorbats, die in der Hemmung der Bildung von Nitrosaminen besteht, bei einer Keiminfektion nur eingeschränkt ausgeübt werden.

1.3 *Helicobacter pylori* und Apoptose

Die Gewebekomöostase im Magenepithel wird gesichert durch ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod. Die Apoptose ist für die überwiegende Menge des Zelluntergangs alternder Zellen verantwortlich (Hall et al., 1994).

Die *Helicobacter pylori*-Infektion führt zu einer gesteigerten Apoptoserate und zu einer gesteigerten Zellproliferation im Magenepithel, die eine kompensatorische Reaktion auf die durch den Keim erhöhten Zellverlust darstellt (Lynch et al., 1995; Moss et al., 1996). In den meisten Fällen bleibt die Gewebekomöostase erhalten, allerdings auf Kosten eines gesteigerten Zellumsatzes. Unklar bleibt über welche Schaltstellen diese differentiellen Effekte vermittelt werden.

Ein disproportionaler Anstieg der epithelialen Apoptose führt zu Zellverlust, welcher sich akut als Ulkus oder chronisch als Atrophie äußern kann. Tatsächlich wurde bei *H. pylori* positiven Ulkuspunkten am Ulkusrand eine erhöhte Apoptoserate gefunden, darüber hinaus wurde beim aktiven Ulkus eine höhere Apoptoserate beobachtet als in der Heilungsphase (Kohda et al., 1999). Auch bei der atrophischen Gastritis wurde eine gesteigerte Apoptose nachgewiesen (Steininger et al., 1998).

Eine disproportionale Reduktion der Apoptose bzw. Anstieg der Proliferation führt zur Akkumulation von Zellen und gilt als Risikofaktor für die gastrale Karzinogenese. In der gastralen Karzinogenese wird folgende pathogenetische Sequenz an Ereignissen angenommen: der chronische Gastritis folgt die atrophische Gastritis, die intestinale Metaplasie und die Dysplasie, die letztendlich zum Karzinom führt.

Diese Befunde legen nahe, daß die *H. pylori* vermittelte Steuerung von Apoptose und Proliferation eine Bedeutung für die Ausprägung bestimmter Spätfolgen der chronischen Gastritis besitzt.

1.4 Der Zelltod

Zellen können auf zwei verschiedene Arten sterben. Zu einer Nekrose kommt es bei physikalischen oder chemischen Verletzungen, z. B. bei einem Sauerstoffmangel, wie er im Herzmuskel während eines Herzinfarktes auftritt oder infolge einer Membranschädigung durch Antikörper. Bei dieser Art der Verletzung schwellen die Zellen an, platzen, setzen den Inhalt ihres Cytosols in den extrazellulären Raum frei und rufen eine Entzündungsreaktion hervor. Das abgestorbene Gewebe wird von phagocytierenden Zellen aufgenommen und abgebaut.

Die andere Form des Zelltodes stellt der programmierte Zelltod oder die Apoptose dar. Diese zelluläre Reaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Gewebeumformung während der Entwicklung, Metamorphose und auch der Aufrechterhaltung der Homöostase aller vielzelligen Lebewesen (Wyllie et al., 1980). Der programmierte Zelltod wird außerdem induziert, wenn schwere DNA-Schäden vorliegen, damit genetische Schäden nicht an Tochterzellen weitergegeben werden können.

In diesem Zusammenhang spielt das Produkt des Tumorsuppressorgens *p53*, das einen Regulator des Zellzyklus darstellt, eine entscheidende Rolle. Fehler in der Regulation werden mit verschiedenen Krankheiten, wie z. B. Krebs, AIDS, Autoimmunerkrankungen und Alzheimer in Zusammenhang gebracht (Carson et al., 1993; Gougeon et al. 1993).

Die Induktion der Apoptose wird über verschiedene intra- und extrazelluläre Signale gesteuert. Als wichtige extrazelluläre Signale für die Auslösung des programmierten Zelltods gelten die Bindung von FAS und TNF- α an ihrer jeweiligen Rezeptoren (Cleveland und Ihle, 1995). Auch durch Glucocorticoide, oxidativen Streß, Zytostatika und den Entzug von Wachstumsfaktoren kann Apoptose ausgelöst werden. Weiterhin wird die Apoptose durch cytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen und ionisierende Strahlung induziert.

Die ersten Veränderungen, die bei der Apoptose beobachtet werden, sind die Fragmentierung der DNA, die Auflösung des Zellkerns und Veränderungen der Zellmorphologie. Die Zelle zerfällt anschließend in sogenannte „apoptotic bodies“. Diese werden von Makrophagen phagozytiert und ihre chemischen Bestandteile wiederverwendet. Im Gegensatz zur Nekrose wird kein zelluläres Material in die Umgebung freigesetzt. Daher geht der apoptotische Zelltod auch nicht mit einer Entzündungsreaktion einher.

Ein häufiges Merkmal des programmierten Zelltods ist die Spaltung der Kern-DNA in Fragmente von 200 Basenpaaren Länge oder eines Vielfachen davon. Dies geschieht durch die Aktivierung endogener Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängiger Nukleasen, die die DNA zwischen den Nukleosomen schneiden, die jeweils 200 Basenpaare DNA enthalten. Da die Nukleosomen-DNA an die Histone H2A, H2B, H3 und H4 gebunden ist, wird sie vor dem Abbau durch die Endonukleasen geschützt (Borgoyne et al., 1974).

Der Prozeß der Apoptose verläuft in mehreren Stufen. Zunächst wird durch eines der oben aufgeführten Signale das Apoptosesignal in der Zelle determiniert. In der folgenden Effektorphase spielt die kaskadenartige Aktivierung von Enzymen der Caspasenfamilie eine entscheidende Rolle. Einige Mitglieder dieser Familie besitzen dabei eine Initiatorfunktion, während anderen eine verstärkende Rolle im Apoptoseprozeß zukommt (Salvesen und Dixit, 1997).

1.5 Der apoptotische Signalweg in der Zelle

Rezeptoren mit Funktionen für Differenzierung, Immunantwort und Zelltod werden unter anderem der Familie der TNF-Rezeptoren zugeordnet. Für einige dieser Mitglieder wurde eine Apoptose auslösende Aktivität nachgewiesen, wie z. B. für den Fas- (APO-1-/CD95-) Rezeptor, der Ähnlichkeiten mit dem TNF-Rezeptor1 aufweist, obwohl sie sich in ihrer Funktion erheblich unterscheiden können. TNF ist zusätzlich ein Induktor des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der die Expression von Genen steuert, die das Überleben der Zelle gewährleisten, während die biologische Funktion von Fas hauptsächlich auf die Apoptose beschränkt ist (Schulze-Osthoff et al., 1994).

Es bestehen zwei Wege, auf denen der Zelltod in der Zelle induziert werden kann. Der extrazellulärer, ligandenvermittelte Signalweg verläuft über die genannten Rezeptoren.

TNF α - und Fas-Rezeptoren besitzen eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne, die den Liganden binden und eine intrazelluläre Domäne, auch „death domain“ genannt, die die Fähigkeit besitzt, zytotoxische Signale weiterzuleiten. Die Ligandenbindung an den Fas-Rezeptor löst eine Rezeptoroligomerisierung aus, gefolgt von der Rekrutierung eines Adapterproteins FADD an die DD. Die Todeseffektor-Domäne (DED) des Adapterproteins bindet eine homologe DED einer aktivierenden Procaspase (8 und 10) und verknüpft so das extrazelluläre Signal mit der Apoptosemaschinerie in der Zelle. Die Komplexbildung aus DD, FADD und Caspase wird als DISC bezeichnet (death-inducing signaling complex).

Caspasen spielen eine direkte Rolle in der proteolytischen Spaltung von zellulären Proteinen im Verlaufe der apoptotischen Veränderung einer Zelle. Caspasen sind cysteinreiche Proteasen, die die Fähigkeit besitzen, ihr Substrat nach Aspartatresten zu schneiden.

Caspasevorläufer werden an konservierten Asp-Resten gespalten, mit dem Ergebnis, daß die meisten aktivierten Caspasen sich selbst oder andere Caspasevorläufer aktivieren können. Die aktive Form, ein Heterodimer, enthält eine große und eine kleine Untereinheit, die innerhalb der Caspasefamilie hochkonserviert sind. Zu diesem Zeitpunkt sind zehn Mitglieder der Caspasefamilie identifiziert, die zwei verschiedenen Signalwege induzieren: Die Caspasen 1, 4, 5 und 11 führen zu einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen während die Caspasen 2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10 Förderer der Apoptose darstellen (Salvesen et al., 1997).

Das erste Protein, das entdeckt wurde und im Verlauf des apoptotischen Geschehens ein Substrat von Caspasen ist, ist die Poly(ADP-Ribose)Polymerase. Hinzu kommen weiterhin die DNA-Polymerase-Kinase, die Proteinkinase C, die snRNP-Komponente U1 und Regulatoren des Zellzyklus, wie MDM2. Caspasen mit ausführender Funktion aktivieren zelluläre Proteine, die an der Fragmentierung der DNA beteiligt sind (Liu et al., 1997). Eine Spaltung von Lamin, Gelsolin, β -Catenin und Keratin durch Caspase 6 ist wohl zum größten Teil für die komplette Reorganisation der zellulären Morphologie während der Apoptose verantwortlich (Schulze-Osthoff et al., 1994).

Bei der Initiation des Zelltodes über den Fas-Liganden werden zunächst die Initiator-Caspasen 8 und 10 aktiviert. Diese Caspasen aktivieren dann direkt oder indirekt die ausführenden Caspasen 2, 3, 4, 6, 7 und 9. Die wohl am häufigsten durch apoptotische Signale aktivierte Caspase ist die Caspase 3 (Salvesen et al., 1997).

Eine bedeutende Rolle in der Regulation des apoptotischen Geschehens spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Dabei wird den Proteinen Bax, Bad, Bak, Bid, Bim, Bcl-XS und Bik eine apoptosestimulierende Wirkung zugeschrieben, während von Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1 und Mcl-1 ein inhibierender Einfluß ausgeübt wird. Die Proteinfamilie besitzt strukturelle Homologien in vier konservierten Domänen (BH1, BH2, BH3 und BH4). Die antiapoptotischen Vertreter Bcl-2 und Bcl-x_L besitzen alle vier Domänen, die proapoptotischen Proteine Bax und Bak nur die BH-Domänen 1, 2 und 3. Weiterhin gibt es die proapoptotischen Nur-BH3-Domäne-Proteine wie Bad und Bid. Diese Domäne scheint für die Heterodimerisierung mit den antiapoptotischen Proteinen erforderlich zu sein.

Im intrazellulären, streßinduzierten Signalweg, der durch viele apoptotische Stimuli beschriftet wird, sind die Mitochondrien involviert. Durch die Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in das Cytosol und die darauffolgende Bindung an Apaf-1 wird die CARD des Apaf-1 demaskiert und kann somit die Procaspase 9 binden. Diese wird innerhalb des Komplexes zu Caspase 9 aktiviert.

Die Proteine der Bcl-2-Familie scheinen an der Regulierung von mitochondrialen Poren beteiligt zu sein, die das Membranpotential der inneren Membran aufrechterhalten (Kroemer et al., 1997; Marzo et al., 1998). Eine Störung des Gradienten führt zum Anschwellen des Mitochondriums und der Freisetzung von Ca²⁺ und Intermembranproteinen, wie z. B. Cytochrom *c* (Kroemer et al., 1997).

Antiapoptotische Mitglieder wie Bcl-2 und Bcl-x_L binden an die Außenmembran der Mitochondrien und blockieren den Cytochrom *c*-Ausstrom (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). Im Gegensatz dazu fördern proapoptotische Mitglieder, wie Bid, Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom *c* und anderen Proteinen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (Desagher et al., 1999; Finucane et al., 1999; Kluck et al., 1999) durch Bindung an die Membran und Ausbildung eines ionendurchlässigen Kanals (Eskes et al., 2000).

Für die Induktion bzw. die Inhibierung der Cytochrom *c*-Freisetzung aus den Mitochondrien spielt das Verhältnis der pro- und antiapoptotischen Proteine, die an die Mitochondrienmembran binden, eine entscheidende Rolle, da die Proteine sowohl kompetitiv als auch kooperativ über die BH3-Domäne dimerisieren können.

Es sind zwei verschiedene Signalwege der durch Fas-vermittelten Apoptose bekannt (Scaffidi et al., 1998). Die Fas-vermittelte Apoptose in Zellen des Typs I wird durch Aktivierung der

Caspase 8 induziert, die wiederum direkt die Caspasen 3, 6 und 7 schneidet und damit aktiviert (Kuwana et al., 1998). Im Gegensatz dazu benötigen die Zellen des Typs II nur geringe Mengen aktivierter Caspase 8, um Apoptose auszulösen. Typ II-Zellen aktivieren ausführende Caspasen über die Spaltung proapoptotischer Proteine, wie z. B. Bid, welches die Cytochrom *c*-Freisetzung aus den Mitochondrien induziert und die Aktivierung von Procaspase 9 über die Bildung eines Komplexes mit Apaf-1 (Yang et al., 1997; Bossy-Wetzel et al., 1998) fördert. Caspase 9 ist dann in der Lage, weitere Effektor-Caspasen proteolytisch zu spalten und damit zu aktivieren.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Das Bakterium *Helicobacter pylori* stellt einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor für die Entstehung von Gastriden und Ulkuserkrankungen dar. Obwohl verschiedene keimspezifische Virulenzfaktoren identifiziert werden konnten, ist bisher nur teilweise verstanden, wie der Keim zu den oben genannten, unterschiedlichen Erkrankungen führt und welche molekularen Mechanismen die mukosale Veränderung verursachen.

Die Induktion der Apoptose in den Magenepithelzellen spielt für die Entstehung der Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Der auslösende Faktor ist jedoch nicht bekannt.

Daher bestand das Ziel dieser Arbeit darin, durch proteinchemische Aufreinigungsmethoden eine Strategie zur Aufreinigung dieses Faktors aus *H. pylori* zu entwickeln und Sequenzdaten zu erhalten.

Als Testsysteme dienten AGS-Zellen, deren Apoptoseraten in verschiedenen Assays (Histon-Elisa, DNA-Färbung) nach Inkubation mit dem Bakterium aus verschiedenen Aufreinigungsschritten (Protein-Fällungen, flüssigkeitschromatographische Aufreinigungen) detektiert wurden.

Nachdem der Faktor für die Auslösung des programmierten Zelltods identifiziert werden konnte, sollten mögliche Strategien zur Verminderung der faktorinduzierten Apoptose entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinie

Die verwendete Magenmukuszelllinie AGS (ATCC 1739-CRL), eine schleimproduzierende Magenepithelzelllinie, wurde von der American Type Culture Collection bezogen. Sie entstammt aus einem 1979 isolierten humanen Adenokarzinom einer 54 Jahre alten Frau.

2.1.2 Bakterien-Stämme

Der verwendete *Helicobacter*-Stamm *Hp* 87 wurde aus Gastritispatienten isoliert und von Dr. Siegfried Wagner (Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie der MHH) zur Verfügung gestellt. Die Charakterisierung bezüglich des Vac- und Cag-Status wurde mittels RT-PCR durchgeführt. *Hp* 87 stellt einen für beide Pathogenitätsfaktoren positiven Keim (VacA⁺/CagA⁺) dar.

Ein weiterer verwendeter Stamm P12 wurde von Prof. Rainer Haas (Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt. Es wurden ein Wildtyp (VacA⁺/CagA⁺) und die isogenen Deletionsmutanten P12Δ*vacA* (VacA⁻/CagA⁺), P12Δ*cagA* (VacA⁺/CagA⁻) und P12ΔPAI (Deletion der kompletten *cag*-Pathogenitätsinsel) eingesetzt.

2.1.3 Geräte

Begasungsbrutschrank Cellstar

Nunc, Wiesbaden

Begasungsbrutschrank

Heraeus Sepatech, Osterode

Biofuge pico

Heraeus Sepatech, Osterode

Biofuge fresco

Heraeus Sepatech, Osterode

Centriluter Micro-Elektroeluter

Amicon, Bedford

Elektrophoresekammer Mini-Protean-N	Bio-Rad, USA
Elektrophoresekammer Protean [®] II xi Cell	Bio-Rad, USA
Elektrophoresis Power Pac 1000	Bio-Rad, USA
Elisareader MR 50000	Dynatech, Denkendorf
Entwickler Optimax	Protec, Deutschland
FPLC-Chromatographieanlage	Amersham Pharmacia, Freiburg
Filmcasette	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gelfiltrationssäule Fractogel [®] EMD Bio-SEC	Merck, Darmstadt
Geltrocknungsrahmen	Novex, San Diego, USA
Inverses Licht- und Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Kühlfalle RT 400 A	Savant, USA
Magnetrührer Combimag	Ika, Staufen i. Br.
Membranpumpe ME4C	vacuubrand, Wertheim
Mikroskopkamera SC 35	Olympus, Hamburg
Multipetten	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Schwerzenbach
Pipetten, verstellbar	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
Proteinsequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Säulenzubehör	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, Kehlheim
Schüttler Titramax 1000	Heidolph, Kehlheim
Semi Dry-Elektrolotter	
ThePanther [™] Modell HEP-1/HEP-3	OWL Separation Systems
Sonifier 250 cell disruptor	Branson, USA
Speedvac SVC 100	Savant, USA
Spektrophotometer UVIKON 930	Kontron Instruments, Schweiz
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman, USA
Rotor TL 100.3	Beckman, USA
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech, Osterode

2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Aldrich Chemical Company Inc., USA	Polyvinylalkohol TMB8
Amersham Pharmacia, Braunschweig	ECL TM Western Blotting-Reagenz Hyperfilm MP Rainbow-Marker RPN 756 Sephacryl S 200
Amicon, Bedford	Centricon Plus 20 Centricon YM-10 Centriluter Probenröhrchen
Baker, J.T., Deventer	Chloroform Essigsäure Methanol Salzsäure
Becton Dickinson, Heidelberg	Columbia-Agar-Platten mit 5 % Schafsblut
Biochrom KG, Berlin	Dulbeccos PBS
Biomol GmbH, Hamburg	Glycin Phenol TEMED Tricine
Bio-Rad Laboratories, USA	Bradford Protein Assay-Reagenz HIC-Methyl-Support Keramisches Hydroxylapatit Macroprep Typ II PVDF-Membran

Boeringer, Mannheim	LDH Zytotoxizitäts-Assay Kit
Calbiochem, USA	Anti-Hsp60 Antikörper Klon LK-2 HSP60 human, rekombinant (E. coli)
Eppendorf, Hamburg	Combitips, verschiedene Größen Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml
Fluka Chemie AG, Neu Ulm	Trockenmilch Tween 20
Gelman Sciences, USA	0,2 µm Sterilfilter
Gibco, Eggenstein	BHI FCS Hefe-Extrakt RPMI-Medium
Greiner, Frickenhausen	250 ml Gewebekulturflaschen 24-Well-Gewebekulturplatten Pipetten, steril
Merck, Darmstadt	Ammoniummolybdat Calciumchlorid Dihydrat Di-Kaliumhydrogenphosphat Di-Natriumhydrogenphosphat D-Glucose EDTA Ethanol HEPES Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat

	Lanthanchlorid
	Magnesiumchlorid
	Malachitgrün
	Natriumazid
	Natriumchlorid
	Natriumcitrat-Dihydrat
	Natriumhydrogencarbonat
	Phenolrot
	Ponceau S
	Schwefelsäure
	Tris
	Trypanblau
Novex, San Diego	Cellophanblätter
PAA Laboratories GmbH, Linz	Penicillin-Streptomycin 10000 U/ml
	L-Glutamin 200mmol/l
Roche GmbH, Mannheim	Histon-Elisa ^{plus} Kit
Roth GmbH, Karlsruhe	Acrylamid 30%
	Anodenpuffer Roti-Blot A
	Dialyseschlauch
	Kathodenpuffer Roti-Blot K
Sarstedt, Nümbrecht	96-Well Mikrotiterplatten
	Pipettenspitzen
Schering, Bloomfield	Schering 28080
Serva, Heidelberg	Acrylamid 40 %
Sigma, Deisenhofen	Ammoniumchlorid
	Ammoniumsulfat

ϵ -Aminocapronsäure
APS
ATP Tris-Salz
BisTris
Bromphenolblau
Coomassie Brilliant Blue G 250
Dextransulfat
DMSO
Glycerin
Harnstoff
Mercaptoethanol
Molekulargewichtsstandards Gelfiltration
MTT
Nifedipin
Oubain
PEG 8000
Rinderserumalbumin, BSA
SDS
Sphingomyelinase, neutral
Trypsin
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

Transduction Laboratories, Lexington

Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert

2.2 Methoden

2.2.1 Puffer und Lösungen

Medien und Puffer für die Zellkultur

Gebrauchsmedien für die Zellzucht:	RPMI 1640 Medium mit Glutamin, FCS 10 %, hitzeinaktiviert, Penicillin/Streptomycin 100 U bzw. µg/ml L-Glutamin 200 mmol/l
Einfriermedium:	Gebrauchsmedium mit 10 % DMSO
Trypsinlösung:	Puffer A: 6,8 g/l NaCl 2,2 g/l NaHCO ₃ 0,4 g/l KCl
	Puffer B: 55,0 g/l NaCl 5,0 g/l KCl 100 g/l Na-Citrat-Dihydrat
	Gebrauchslösung: 100 ml Puffer A 10 ml Puffer B 0,25 g Trypsin 0,1 g Glucose
Dulbeccos PBS:	0,2 g/l KCl 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ 8,0 g/l NaCl 1,4 g/l Na ₂ HPO ₄
Trypanblau-Lösung:	0,4 % Trypanblau in 0,9 % NaCl

Medien für die Kultur von *Helicobacter pylori*

Columbia Agar-Platten:

- 12,0 g pankreatisch abgebautes Casein
- 5,0 g peptisch abgebautes Tiergewebe
- 3,0 g Hefeextrakt
- 3,0 g Rindfleischextrakt
- 1,0 g Maisstärke
- 5,0 g NaCl
- 13,5 g Agar
- 5 % defibriniertes Schafblut

Flüssigkulturmedium:

- 38 g/l BHI
- 2,5 g/l Hefe-Extrakt
- 10 % FCS
- sterilfiltriert

Einfriermedium: Flüssigkulturmedium mit 10 % Glycerin

Gelfiltration

Elutionspuffer: 9,55 g/l PBS

Hydroxylapatit

Puffer A: 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Puffer B: 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Puffer C: 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
1 M KCl

Puffer D: 500 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4
1 M KCl

Hydrophobe Interaktion

Puffer A:	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 2 M Ammoniumsulfat
Puffer B:	100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

Histon-Elisa

Immunomix:	1 Teil anti-DNA-Peroxidase 1 Teil anti-Histon-Biotin 18 Teile Inkubationspuffer
------------	---

Ureasetest

Reaktionspuffer:	5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 1-200 mM Harnstoff 7µg/ml Phenolrot
------------------	--

SDS-Gelelektrophorese:

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 14 mM SDS
Trenngel 10 %:	16,3 ml bidest. H ₂ O 10 ml Trenngelpuffer 10 ml Acrylamid (30%) 400 µl APS (10 %) 40 µl TEMED

Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 14 mM SDS
Sammelgel:	12,8 ml bidest. H ₂ O 5,2 ml Sammelgelpuffer 4 ml Acrylamid (30%) 100 µl APS 20 µl TEMED
Tankpuffer für SDS-Gel:	25 mM Tris/HCl 3,5 mM SDS 192 mM Glycin
Probenpuffer:	4,2 ml bidest. H ₂ O 1 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,8 ml Glycerin 0,55 mM SDS 0,4 ml Mercaptoethanol einige Körnchen Bromphenolblau

BN-PAGE

Probenpuffer:	500 mM ε-Aminocapronsäure 50 mM NaCl 20 mM BisTris pH 7 10 % Glycerin
Gelpuffer:	200 mM ε-Aminocapronsäure 50 mM BisTris pH 7

Gradienten-Trenngel 5,5 %:	13,7 ml bidest. H ₂ O 8,3 ml Gelpuffer 2,8 ml Acrylamid (40 %) 100µl APS 10 µl TEMED
Gradienten-Trenngel 18 %:	1 ml bidest. H ₂ O 8,3 ml Gelpuffer 9 ml Acrylamid (40 %) 6,6 ml Glycerin 100µl APS 10 µl TEMED
Sammelgel:	5 ml bidest. H ₂ O 2,8 ml Gelpuffer 685 µl Acrylamid (40 %) 30 µl APS 3 µl TEMED
Anodenpuffer:	50 mM BisTris pH 7
Kathodenpuffer:	50 mM Tricine 15 mM BisTris pH 7 0,02 – 0,2 % Coomassie G250
<u>Elektroelution</u>	
Elutionspuffer:	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin

Western Blotting

Anodenpuffer:	1:10-Verd. in dest. Wasser 10 % Methanol
Kathodenpuffer:	1:10-Verd. in dest. Wasser 10 % Methanol
TBS-Puffer:	25 mM Tris/HCl, pH 7,6 15 mM NaCl
TTBS-Puffer:	TBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20
Blockpuffer:	TTBS mit 5 % Trockenmilch

Antikörperinkubation

1. Antikörper:	Anti-Hsp60 1:1000 (Wirt:Maus; Klon LK2) in TTBS mit 1 % BSA und 0,15 % Na-Azid
2. Antikörper:	Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert 1:10000 in TTBS mit 5 % Trockenmilch
ECL TM Western Blotting-Reagenz:	1 Teil Lösung 1 1 Teil Lösung 2

Coomassiefärbung von Acryamidgelen

Färbelösung:	50 % v/v Methanol 0,01 % Coomassie 10 % v/v Essigsäure
Entfärber:	7,5 % v/v Essigsäure 35 % v/v Metahnol

Coomassiefärbung von PVDF-Membranen

Färbelösung:	40 % (v/v) Methanol 0,25 % (v/v) Essigsäure 0,025 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue
Entfärber:	50 % (v/v) Methanol

Trocknen von Acrylamidgelen

Trockenlösung:	20 % v/v Ethanol 5 % w/v Glycerin
----------------	--------------------------------------

Ponceau-Protein-Färbung

Gebrauchsreagenz:	0,3 % Ponceau S 1% Essigsäure in aqua dest.
-------------------	--

ATPase-Assay

Reaktionspuffer:	10 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA
Molybdatlösung:	0,1 M Ammoniummolybdat in 2 M HCl
Malachitgrünlösung:	0,042 % Malachitgrün in 1 % Polyvinylalkohol

LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Reaktionslösung:	11,25 ml Diaphorase/NAD ⁺ -Katalysator 250 µl Farbstofflösung (INT + Na-Lactat)
------------------	---

Proteinbestimmung nach Bradford

Gebrauchsreagenz:	1:5-Verd. in aqua dest.
-------------------	-------------------------

2.2.2 *Helicobacter pylori*

2.2.2.1 *Helicobacter pylori*-Kultur und Stammhaltung

Helicobacter pylori wurde 48 h auf Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut ausgesät und unter mikroaerophilen Bedingungen (Gasgemisch aus 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) bei 37 °C angezüchtet. Zur Stammerhaltung wurde der Keim mit einer sterilen Öse von den Agarplatten geerntet und in Einfriermedium resuspendiert. Die optische Dichte der Suspension wurde auf 1,0 eingestellt. Jeweils 1 ml wurde in sterile Einfriergefäße überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung eines *Helicobacter-pylori*-Sonikates

Der Keim wurde mit einer sterilen Öse von 48 h inkubierten Agarplatten geerntet, in RPMI Medium suspendiert und 2 x gewaschen (10000 rpm; 4 °C; 5 min). Der Überstand wurde abgenommen, der Keim in RPMI Medium aufgenommen und in Eiswasser in 2 min-Intervallen sonifiziert, bis eine klare Lösung entstand. Das resultierende Sonikat wurde bei 13000 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Durch eine anschließende Ultrazentrifugation bei 50000 rpm bei 4 °C für 30 min wurden die löslichen Proteine von den hochmolekularen Zellbestandteilen abgetrennt. Danach wurde das Sonikat bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Magenzelllinie AGS

2.2.3.1 Kultur der Magenzelllinien

Die Zellen wurden in 250 ml-Gewebekulturflaschen mit 20 ml Medium bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 98 % inkubiert. Die Zellen wurden nach Bedarf jeden 2. bis 3. Tag geteilt und in neue Flaschen umgesetzt. Dafür wurde das Zellkulturmedium jeder Flasche dekantiert und die Zellen mit 2 ml Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Danach wurden sie in frischem Gebrauchsmedium resuspendiert und in neue Flaschen ausgesät.

2.2.3.2 Einfrieren von Magenzellen

Die Zellen einer Kulturflasche wurden durch Trypsineinwirkung vom Flaschenboden gelöst und in Gebrauchsmedium resuspendiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in sterile Einfriergefäße überführt. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, die langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff.

2.2.3.3 Aussaat von Zellen für Kulturexperimente

Das Zellkulturmedium jeder 250 ml-Kulturflasche wurde dekantiert, mit 5 ml PBS gespült und die Zellen mit 2 ml Trypsinlösung vom Flaschenboden abgelöst. Die Suspension wurde in Zellkulturmedium resuspendiert, bei 1530 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min zentrifugiert und anschließend in frischem Gebrauchsmedium aufgenommen. Eine Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0.1 mm). Die Vitalität der Zellen wurde durch eine 1:1,25-Mischung der Zellsuspension mit Trypanblau, das nur in tote Zellen eindringt, überprüft.

2.2.4 Methoden zur Proteinfällung

2.2.4.1 Ammoniumsulfatpräzipitation

Eine Zugabe von neutralen Salzen kann zur reversiblen Präzipitation von Proteinen führen. Die Effizienz dieses Aussalz-Effektes ist sowohl von der Natur des Anions als auch des Kations abhängig. Allgemein gilt, daß Salze mit oligovalenten Anionen und monovalenten Kationen, d. h. mit geringem chaotropischen Effekt, am effektivsten Proteine auszufällen vermögen. Aufgrund seiner geringen Lösungsenthalpie und seiner hohen Wasserlöslichkeit ist Ammoniumsulfat ein geeignetes Präzipitationsmittel. Mit dieser Methode werden hauptsächlich Immunglobuline gefällt.

Zur Fällung der *Helicobacter pylori*-Proteine, die keine Apoptose auslösten, wurde die Proteinlösung bei 4 °C mit Ammoniumsulfat verschiedener Konzentrationen versetzt. Das feinkristalline Ammoniumsulfat wurde langsam unter ständigem Rühren innerhalb von 30 min zugegeben und die Suspension weitere 30 min gerührt. Die Präzipitation wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C vervollständigt. Der Überstand wurde gegen einen zu dem folgenden Aufreinigungsschritt gehörenden Puffer über Nacht dialysiert.

2.2.4.2 Präzipitation durch Erhitzen

Um den Temperaturbereich, in dem die an der Auslösung der Apoptose beteiligten *Helicobacter pylori*-Proteine stabil waren zu ermitteln, wurde das Sonikat für 30 min bei verschiedenen Temperaturen erhitzt.

Ausgefällte, hitzesensitive *Helicobacter pylori*-Proteine, die keine Apoptose auslösten, wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 min abgetrennt.

2.2.4.3 Präzipitation durch organische Lösungsmittel

Mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel sind allgemein gute Fällungsreagenzien für Proteine, da ihre niedrige Dielektrizitätskonstante die Solvationskraft der wässrigen Lösungen für gelöste Ionen, wie z. B. Proteine, herabsetzt. Das Verfahren wird normalerweise bei 0 °C angewandt, da bei höheren Temperaturen organische Lösungsmittel die Denaturierung begünstigen.

Ethanol hat sich besonders bei der Fällung von Plasmaproteinen bewährt. Für Proteinlösungen, die noch Lipide enthalten, wird oft Aceton eingesetzt, da neben der Präzipitation der Proteine gleichzeitig die Lipide extrahiert werden.

Zur Fällung der *Helicobacter pylori*-Proteine, die keine apoptotische Aktivität zeigten, wurde die Proteinlösung bei 0 °C langsam mit verschiedenen Ethanol- (v/v) bzw. Acetonkonzentrationen (v/v) versetzt. Das Präzipitat wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C bgetrennt. Der Überstand wurde zur Entfernung des Lösungsmittels in einer Vakuumzentrifuge einroutiert.

2.2.4.4 Präzipitation durch Polyethylenglycol

Eine weitere Methode zur Proteinfällung ist die Präzipitation mit hochmolekularem PEG (MW > 4000).

Zur Fällung der *Helicobacter pylori*-Proteine, die nicht an der Auslösung der Apoptose beteiligt waren, wurde die Proteinlösung bei 0 °C mit verschiedenen PEG 8000-Konzentrationen (v/v) versetzt. Das Präzipitat wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde gegen einen zu dem folgenden Aufreinigungsschritt gehörenden Puffer über Nacht dialysiert.

2.2.5 Einfluß des pH-Wertes

Um den pH-Bereich, in dem das Apoptose auslösende Protein von *H. pylori* stabil war zu ermitteln, wurde das Sonikat mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH auf pH-Werte von 1 – 13 eingestellt. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde über Nacht gegen dest. Wasser dialysiert.

2.2.6 Flüssigkeitschromatographische Trennverfahren

Die chromatographischen Trennungen der *H. p.*-Proteine wurden mit dem FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia bei 4 °C durchgeführt. Die Elutionspuffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,25 µm Ausschlußgrenze) und für 15 min entgast.

2.2.6.1 Gelfiltration

Die Gelchromatographie ist eine Form der Verteilungschromatographie, die zur Trennung von Molekülen unterschiedlicher Größe verwendet wird. Das Prinzip basiert auf der unterschiedlichen Permeation des Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle

verantwortlich. Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren des Trenngels eindringen und eluieren zusammen mit der Lösungsmittelfront. Kleinere Moleküle bewegen sich nicht nur ungehindert zwischen den einzelnen Teilchen der stationären Phase sondern dringen auch in ihre Poren ein und erfahren dadurch eine Verzögerung in ihrer Elution.

Die Fractogel[®] EMD Bio-SEC-Säule der Firma Merck zeigt einen Trennbereich von 5 bis 1000 kDa. Die Säule hat ein Bettvolumen von 72 ml und ein Ausschlußvolumen von 35 ml. Die *H. p.*-Proteine wurden unter einer Flußrate von 1 ml/min mit PBS eluiert und in 1-ml-Fractionen aufgefangen.

Die Trennleistung der Säule wurde in Einzelläufen mit Standardproteinen bestimmt. Dabei wurden die einzelnen Proteine in folgender Reihenfolge eluiert: Amylase 200 kDa (41,2 ml), ADH 150 kDa (42 ml), BSA 66 kDa (44,4 ml), Carbonanhydrase 29 kDa (54 ml), Cytochrom *c* 12,4 kDa (63,4 ml).

Durch die Verwendung von Säulenmaterial mit schärferer Trennleistung (Sephacryl 200 S: Trennbereich: 5 bis 250 kDa) ergab sich für die Elution der Standardproteine folgende Werte: Amylase 200 kDa (15 ml), ADH 150 kDa (17,2 ml), BSA 66 kDa (18,8 ml), Carbonanhydrase 29 kDa (22,5 ml), Cytochrom *c* 12,4 kDa (25,2 ml). Das Ausschlußvolumen dieser Säule beträgt 14,4 ml.

Die Säulen wurden mit 0,5 M NaOH regeneriert und unter 20 % (v/v) Ethanol in H₂O gelagert.

2.2.6.2 Hydroxylapatit

Kristallines Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphatmineral. An der Bindung von Proteinen sind dabei Ca²⁺- und PO₄³⁻-Gruppen über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen involviert. Saure und neutrale Proteine binden dabei an die Ca²⁺-Gruppen, während basische Proteine an die PO₄³⁻-Gruppen adsorbieren. Denaturierte Proteine oder Peptide mit geringem Molekulargewicht binden dagegen sehr schlecht.

Der Probenauftrag wird unter geringen Pufferkonzentrationen bei neutralem pH-Wert durchgeführt. Wichtig ist die Abwesenheit von Substanzen mit hoher Affinität für Ca²⁺ bzw. PO₄³⁻, da diese die Kapazität der Säule verringern würden.

Die Elution basischer Proteine wird unter schrittweiser Erhöhung der einwertigen Kationenkonzentration durchgeführt oder alternativ mit geringen Konzentrationen

zweiwertiger Kationen. Im Gegensatz dazu werden saure Proteine mit Phosphat- oder Fluoridlösungen eluiert.

Die 2 ml-Hydroxylapatit-Säule besteht aus keramischem Macro-Prep[®] vom Typ II von der Firma Bio-Rad (Partikelgröße 80 µm). Keramisches Hydroxylapatit hat gegenüber dem kristallinen den Vorteil der höheren mechanischen und chemischen Stabilität, woraus eine höhere Flußrate resultiert. Dieses Hydroxylapatit hat eine hohe Proteinbindungskapazität besonders für saure Proteine.

Das Protein wurde in Puffer A gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 5 ml Puffer A bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gewaschen. Es folgte ein steigender Phosphat-Gradient über 16 ml bis 44 % Puffer B (220 mM Phosphat). Puffer A wurde gegen Puffer C und Puffer B gegen Puffer D ausgetauscht. Ein weiterer Gradient über 14 ml mit bis zu 100 % Puffer D (finale Phosphatkonzentration: 500 mM) wurde im Anschluß durchgeführt.

Die Regeneration der Säule wurde mit 400 mM Phosphatpuffer bzw. 2 M NaCl durchgeführt. Die Lagerung erfolgte unter Puffer A mit 20 % (v/v) Ethanol und 0,02 % (w/v) Natriumazid.

2.2.6.3 Hydrophobizitätschromatographie

Die Hydrophobizitätschromatographie ist dadurch gekennzeichnet, daß unpolare Oberflächenregionen eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an schwach hydrophobe Liganden einer stationären Phase adsorbieren. Die Zahl, Größe und Verteilung dieser Regionen ist charakteristisch für jedes Protein und wird als Grundlage der Trennung ausgenutzt. Die Assoziationsneigung hängt von der Struktur des Wassers ab und diese wiederum von den darin gelösten Salzen. Hohe Konzentrationen von bestimmten Ionen verstärken die hydrophoben Wechselwirkungen, während chaotrope Salze die Wasserstruktur stören und dadurch die Neigung zu hydrophoben Wechselwirkungen verringern.

Die Elution des Probenmoleküls wird durch die Verringerung der Salzkonzentration erzielt. Diese Art der Chromatographie kombiniert die Eigenschaften einer nicht-denaturierenden Salzpräzipitation (Aggregation aufgrund hydrophober Protein-Protein-Kontakte) mit der Separationskraft der Chromatographie (Wechselwirkungen aufgrund hydrophober Protein-Matrix-Kontakte). Daraus ergibt sich der wesentliche Vorteil, daß die native Form und die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleiben.

Als stationäre Phasen werden sowohl synthetische Polymere als auch Biopolymere verwendet, deren Oberflächen mit unterschiedlichen hydrophoben Liganden modifiziert wurden. Typischerweise werden Alkyl- oder Phenylgruppen eingesetzt. Dabei wird die Selektivität und Kapazität der Matrix im Wesentlichen von der Hydrophobizität und der Dichte der Liganden bestimmt.

Die Matrix der 2 ml-HIC-Säule besteht aus schwach hydrophoben Methylgruppen, die für die Aufreinigung von Proteinen mit wenigen oder schwach hydrophoben Regionen geeignet sind. Das Protein wurde in Puffer A gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 6 ml Puffer A bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gewaschen. Es folgte ein absteigender Ammoniumsulfat-Gradient über 24 ml bis 0 % Puffer A. Ein weiterer Waschschritt über 6 ml mit 100 % Puffer B wurde im Anschluß durchgeführt.

Die Regeneration der Säule erfolgte mit 100 mM Phosphatpuffer. Die Lagerung erfolgte unter dest. Wasser mit 20 % (v/v) Ethanol und 0,02 % (w/v) Natriumazid.

2.2.7 LPS-Extraktion aus *Helicobacter pylori*

Der Keim wurde von 48 h inkubierten Agarplatten in PBS geerntet und einmal gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml dest. Wasser aufgenommen und für 10 min bei 70°C inkubiert. Nachdem die gleiche Menge Phenol (ebenfalls bei 70 °C vorgewärmt) zugegeben wurde, wurde die Mischung weitere 15 min bei dieser Temperatur inkubiert und dann 10 min auf Eis gestellt. Die Probe wurde bei 10000 rpm 25 min abzentrifugiert und die obere, wässrige Phase für 48 h gegen dest. Wasser dialysiert. Im Anschluß wurde die Probe lyophilisiert.

2.2.8 Extraktion von Sphingomyelinasen aus *Helicobacter pylori*

H. pylori wurde nach 48 h Inkubation geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und in 0,2 M Glycin-HCl-Puffer (pH 2,2) aufgenommen. Die Suspension wurde bei 25 °C für 15 min gerührt und dann bei 4 °C und 13000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand, der membrangebundene Proteine enthielt, wurde mit NaOH neutralisiert und über Nacht bei 4 °C gegen dest. Wasser dialysiert. Das Pellet, das die cytosolischen Proteine enthielt, wurde in

50 mM PBS resuspendiert und durch Sonifikation aufgeschlossen. Die Lösung wurde bei 13000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand für weitere Versuche eingesetzt.

2.2.9 Ureasetest

Die Ureaseaktivität des *Helicobacter pylori*-Sonikats wurde spektrophotometrisch nach der Methode von Mobley et al. (1988) bestimmt. Zur Harnstoff-Umsatzbestimmung wurde 50 µl Sonikat (c: 4 mg/ml) aus verschiedenen Aufreinigungsstufen zu variablen Substratkonzentrationen (0,1-100 mM) in 2 ml 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 und 7 µg/ml Phenolrot gegeben und die Ureaseaktivität bei Raumtemperatur und einer OD von 556 nm gemessen.

2.2.10 Bestimmung der Apoptoserate

Dieser Versuch basiert auf dem quantitativen „Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip“, bei dem monoklonale Maus-Antikörper gegen DNA-Fragmente von 180-200 Basenpaaren mit den dazugehörigen Histonen, die bei einem apoptotischen Abbau auftreten, gerichtet sind.

Das Prinzip des Histon-Elisa^{plus} Kits von Roche GmbH erlaubt eine spezifische Determination von Mono- und Oligonukleosomen in einer cytoplasmatischen Fraktion oder einem Zell-Lysat. Die Proben wurden in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert.

Anschließend wurde eine Mischung aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase zugegeben. Während der Inkubationszeit bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histonkomponente der Nukleosomen und fixiert diese an der mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte über die Biotinyl-Bindungskomponente. Zusätzlich reagiert die Anti-DNA-Peroxidase mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Nach der Entfernung von nichtgebundenen Antikörpern durch einen Waschschriff wird die Menge der gebundenen Nukleosomen quantitativ bestimmt. Die Peroxidase des Immunokomplexes setzt das Substrat ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat]) zu einem farbigen Produkt um, dessen optische Dichte dann photometrisch bestimmt wird.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 50000/Well auf 24-Well-Platten in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS, 100 U Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin 200 mM ausgesät und 24 h bei 37 °C inkubiert, um die Zellen adhären zu lassen. Danach folgte eine 24 stündige Inkubation mit den Testsubstanzen.

Die Platten wurden 10 min bei 960 g zentrifugiert. Das RPMI Medium wurde abgesaugt, 1 ml Lysispuffer auf die Wells pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden 10 min bei 960 g zentrifugiert, um die cytoplasmatische Fraktion, die die Mono- bzw. Oligonucleosomen enthält, abzutrennen. Von der cytoplasmatischen Fraktion wurden 20 µl in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und zusammen mit 80 µl des Immunomixes 2 h auf einem Schüttler mit 300 U/min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden nach Inkubationsende durch dreimaliges Waschen mit 200 µl Inkubationspuffer von der Mikrotiterplatte entfernt. Die Quantifizierung der gebundenen Nucleosomen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Substratlösung. Nach bis zu 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD der einzelnen Wells bei 405 nm gemessen.

2.2.11 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Proteine können mit kaltem Aceton oder kurzkettigen Alkoholen gefällt werden. Für die Wahl des organischen Fällungsmittels oder der optimalen Temperatur können keine allgemeingültigen Regeln angegeben werden. Ethanol hat sich besonders bei der Fällung von Plasmaproteinen bewährt. Für Proteine, die noch Lipide enthalten, wird oft ein Methanol/Chloroform-Gemisch eingesetzt, das neben der Präzipitation der Proteine gleichzeitig Lipide extrahiert.

Die Proben wurden mit 0,4 ml Methanol versetzt, gevortext und 2 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wiederholt. Die Lösung wurde mit 0,3 ml aqua dest. versetzt, gevortext und 5 min bei 9000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und die untere mit 0,3 ml Methanol versetzt. Die Lösung wurde gevortext und nochmals 5 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Für eine anschließende SDS-Gelelektrophorese wurde das Pellet in 20 µl PBS gelöst, mit 10 µl Probenpuffer versetzt und bei 95 °C 5 min erhitzt.

2.2.12 Gelelektrophoretische Auftrennung

Tragen Makromoleküle elektrische Ladungen, so wandern sie im elektrischen Feld. Dieses Phänomen wird zur Trennung und Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren ausgenutzt.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das zur Auftrennung der Proteine benutzte Gel in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid hergestellt.

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese, die mit zwei Gelsystemen arbeitet, dient zur schärferen Auftrennung der Proteine.

2.2.12.1 SDS-Gelelektrophorese

Seifen und Detergenzien sind amphipathische Moleküle und stark Protein denaturierende Agentien. Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet sehr fest an Proteine und die große negative Ladung, die Dodecylsulfat auf das Protein überträgt, maskiert dessen eigentliche Ladung, so daß SDS-beladene Proteine nahezu identische Ladung-Masse-Verhältnisse und ähnliche Formen aufweisen. Die Elektrophorese von Proteinen in einem SDS-haltigen Gel trennt sie daher aufgrund der Siebeffekte in der Reihenfolge ihrer molaren Massen.

Die relativen Mobilitäten der Proteine im SDS-Gel sind linear mit dem Logarithmus ihrer molaren Massen korreliert (Laemmli 1970). Durch die SDS-PAGE erhält man in Gegenwart des Reduktionsmittels Mercaptoethanol die molaren Massen der kovalent verknüpften Untereinheiten.

Auf ein 10 %iges, auspolymerisiertes Trenngel wurde das Sammelgel gegossen. Die präparierten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf wurde bei einer Stromstärke von 60 mA bei einer maximalen Spannung von 200 V durchgeführt.

Als Proteinmarker wurde der Rainbow-Marker RPN 756 verwendet.

2.2.12.2 BN-Gelelektrophorese

Ein Vorteil der BN-Gelelektrophorese ist die Erhaltung der biologischen Aktivität der aufgetrennten Proteine und die Möglichkeit, diese aus dem Gel für weitere Analysen zu

eluieren. Bei dieser Gelelektrophorese wird das denaturierende Detergenz SDS gegen Coomassie Blau ersetzt. Coomassie Blau ist wie SDS negativ geladen und bindet an Proteine, die dann bei physiologischem pH-Wert unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt zur Anode wandern. Im Gegensatz zum Trennungsprinzip der SDS-PAGE, bei dem die verschiedenen Proteine verschieden schnell wandern, laufen die Proteinkomplexe in der BN-PAGE anfangs gleich schnell, um dann nach verschiedenen Laufdistanzen zum Stillstand gebracht zu werden. Bei den BN-Gelen handelt es sich um Polyacrylamid-Gele, die einen Gradienten von 5,5 bis 18 % besitzen.

Die Trenngele unterschiedlicher Konzentration wurden in einen Gradientenmischer gegeben (die hochprozentige Gelmischung in die vordere, die niedrigprozentige in die hintere Kammer). Nach Zugabe von APS und TEMED wurde das Verbindungsstück zwischen den Kammern geöffnet und der Gelmix in die Gelkammer gepumpt. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die präparierten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert, mit Kathodenpuffer überschichtet und in den Geltank mit Anodenpuffer gestellt. Nach dem Einwandern der Proben in das Gel bei 100 V, wurde der weitere Gellauf bei einer maximalen Spannung von 500 V durchgeführt. Nach der Hälfte des Laufes wurde der blaue Kathodenpuffer gegen den gleichen Puffer mit 0,002 % Coomassie Blau ausgetauscht, um eine Entfärbung während des Gellaufes zu erreichen.

Als Proteinmarker wurde der Rainbow-Marker RPN 756 verwendet.

2.2.13 Färbung und Trocknung der Gele

2.2.13.1 Färbung mit Coomassie

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 60 min in der Färbelösung inkubiert und im Anschluß daran bis zur gewünschten Signalstärke in Entfärber gewaschen.

2.2.13.2 Trocknen der Gele

Das Gel wurde nach mehrmaligem Waschen in Wasser 30 min in der Geltrocknungslösung äquiliert und zwischen zwei ebenfalls in der Trockenlösung eingeweichten Cellophanblättern in einen Trocknungsrahmen eingespannt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknungszeit lag zwischen 24 und 48 Stunden.

2.2.14 Elektroelution der geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine

Eine effiziente Methode, um geleelektrophoretisch aufgetrennte Proteine für weitere Untersuchungen wieder in Lösung zu bringen, ist die Elektroelution. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbanden aus dem Gel heraus in ein Auffanggefäß, das mit einer Membran versehen ist, die die eluierten Proteine nicht passieren können.

Zur Elektroelution der durch die BN-Geleelektrophorese aufgetrennten *H. p.*-Proteine wurden einzelne Proteinbanden aus dem Gel herausgeschnitten und in ein Centrilutor-Probenröhrchen überführt. Nach Befüllen der unteren Kammer mit Elutionspuffer wurden die Centrilutor-Probenröhrchen in die Öffnungen der oberen Kammer gesteckt. Auf der Unterseite der Probenröhrchen wurden Centricon YM-10 zum Auffangen der eluierten Proteine befestigt. Die obere Kammer wurde auf die untere Kammer gestellt und mit Elutionspuffer gefüllt. Die Elution wurde bei einer maximalen Spannung von 200 V für 2 h durchgeführt.

Nach der Elution wurden die Centricons entnommen und die darin befindlichen Proteine nach Vorschrift der Fa. Amicon durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

2.2.15 Western-Blotting der geleelektrophoretisch aufgetrennten Proteine

Unter Western-Blotting versteht man den elektrophoretischen Transfer negativ geladener SDS-Protein-Komplexe auf eine Membran. Die proteinbeladene Membran kann mittels spezifischer Nachweismethoden zur Untersuchung der transferierten Proteine dienen.

Außerdem eignet sie sich für die direkte Sequenzierung der auf der Membran fixierten Proteine.

Dazu wurden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine im Anschluß mittels der horizontalen „Semi-Dry-Blot“-Methode auf eine PVDF-Membran transferiert.

Das Gel wurde nach dem Gelelektrophorese-Lauf 15 min in Kathodenpuffer equilibriert, die PVDF-Membran kurz in Methanol eingeweicht, danach 2 min in aqua bidest. und anschließend in Kathodenpuffer equilibriert. Fünf Filterpapiere wurden ebenfalls kurz in Kathodenpuffer, fünf weitere in Anodenpuffer eingeweicht.

Das Blotten erfolgte in einer Semi Dry Blotapparatur: auf die untere Kathodenseite wurden 5 Filterpapiere gelegt, gefolgt vom Gel, der PVDF-Membran und weiteren in Anodenpuffer eingeweichten Filterpapieren. Nach Auflegen der Anodenplatte wurde 90 min bei einer Stromstärke von $1,5 \text{ mA/cm}^2$ geblottet.

Nach dem Blotvorgang wurde für die anschließende Sequenzierung ein direkter Proteinnachweis mittels Coomassie-Färbung auf der Membran durchgeführt, um die Lage der zu sequenzierenden Banden bestimmen zu können.

Die PVDF-Membran wurde 90 sec in der Färbelösung geschwenkt und für 3 x 30 sec entfärbt. Nach einem Waschgang mit Wasser wurde die Membran getrocknet und die zu sequenzierenden Proteine ausgeschnitten.

2.2.16 Protein-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Kandidatenproteinen wurde in Kooperation mit Dr. Harald John von der IPF PharmaCeuticals GmbH in Hannover durchgeführt.

Die Proteinbanden, die für eine Sequenzierung in Frage kamen, wurden aus der PVDF-Membran ausgeschnitten. Die Sequenzbestimmung erfolgte in einem automatischen Sequenzer der Fa. Applied Biosystems.

Dieser Sequenzer führt in einem automatisierten Zyklus den Edman-Abbau durch. Dabei reagiert Phenylisothiocyanat (PITC) mit terminalen Aminogruppen von Proteinen unter milden alkalischen Bedingungen unter Bildung von Phenylthiocarbamoyl-Addukten. Die Behandlung mit wasserfreier Flußsäure spaltet den N-terminalen Rest selektiv als Thiazolin-Derivat ab, ohne daß dabei andere Peptidgruppen hydrolysiert werden. Die Thiazolin-

Aminosäure wird selektiv mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert und durch Behandlung mit wässriger Säure in das stabilere Phenylthiohydantoin-Derivat (PTH) überführt. Während das um eine Aminosäure verkürzte Protein wiederum mit PITC reagiert, wird die PTH-Aminosäure vollautomatisch mittels eines HPLC-Laufes über seine Retentionszeit identifiziert.

2.2.17 Antikörperinkubation

Die über Elektrotransfer auf die PVDF-Membran übertragenen und immobilisierten Proteine, die das Antigen darstellen, wurden nacheinander mit zwei Antikörpern inkubiert. Der Primärantikörper richtet sich spezifisch nur gegen das jeweilige Antigen. Der Sekundärantikörper, ein Anti-Immunglobulin, bindet an Primärantikörper jeder beliebigen Spezifität und ist häufig mit einer Peroxidase komplexiert.

Für eine Antikörperinkubation wurde nach dem Blotvorgang die PVDF-Membran 1 h in TTBS mit 5 % Trockenmilch geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu unterbinden. Danach wurde dreimal 5 min mit TTBS gewaschen.

Die PVDF-Membran wurde mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit TTBS wurde die PVDF-Membran mit dem 2. Antikörper (Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert) in einer 1:10000-Verdünnung in TTBS mit 5 % Trockenmilch für 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TTBS wurde die Detektion durchgeführt.

2.2.18 Detektion

Das Prinzip der Chemilumineszenz beruht auf der Anregung eines Chromophors in ein höheres Energieniveau durch eine chemische Reaktion. Die Abgabe dieser überschüssigen Energie erfolgt in Form von Licht bei einer Wellenlänge von 428 nm, die durch eine Exposition auf einem Blaulicht sensitiven Film sichtbar gemacht werden kann. Bei der ECL-

Detektion wird das Chromophor Luminol unter alkalischen Bedingungen von der HRP oxidiert und somit in ein erhöhtes Energieniveau überführt. Eine Steigerung der Signalstärke wird durch das Vorhandensein von chemischen Verstärkern, wie z.B. Phenol erreicht.

Die Membran wurde kurz mit Whatmanpapier getrocknet und anschließend 1 min mit dem ECLTM Western Blotting-Reagenz benetzt. Nach erneutem Trocknen der Membran, wurde diese 10 sec bis zu 10 min auf einem Film exponiert. Die Länge der Exposition richtete sich nach der Stärke der Immunreaktion.

Nach der Detektion wurde die Membran 2-3 min in Ponceau-Lösung gefärbt, um zu überprüfen, ob die Proteinauftragung gleichmäßig war.

2.2.19 ATPase-Assay

Die ATPase-Aktivität wurde nach der Methode von Carter und Karl (1982) bestimmt. Dazu wurde 1 ml Reaktionspuffer mit 100 µg Proteinprobe und 10 mM Salzlösung (NaCl, KCl und NH₄Cl) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 2 mM Tris-ATP gestartet. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 1 N HCl gestoppt. 1 ml dieser Lösung wurde dann mit 0,7 ml Molybdatlösung und 0,3 ml Malachitgrünlösung versetzt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml 7,8 %iger H₂SO₄ wurde die OD des Reaktionsproduktes bei 625 nm gemessen.

2.2.20 LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Dieser Test basiert auf der Detektion der Aktivität des cytoplasmatischen Enzyms LDH, das bei Membranschädigungen aus der Zelle freigesetzt und in das Zellkulturmedium abgegeben wird. Die LDH-Aktivität wird durch einen enzymatischen Test bestimmt: im ersten Schritt wird NAD⁺ zu NADH+H⁺ durch die LDH-katalysierte Oxidation von Lactat zu Pyruvat reduziert; im zweiten Schritt überträgt der Katalysator Diaphorase H+H⁺ vom NADH+H⁺ auf das Tetrazoliumsalz INT, welches dadurch zum roten Formazansalz reduziert wird und bei 500 nm detektiert werden kann.

Der LDH-Test wurde zusätzlich zum Histon-Elisa durchgeführt, um eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen treffen zu können, die bei Nichtberücksichtigung zu falsch interpretierten Werten beim Histon-Elisa führen konnten. Nur nekrotische und spätapoptotische Zellen geben ihre cytoplasmatischen Enzyme in das Zellkulturmedium ab, bei apoptotischen Zellen dagegen wird kein zelluläres Material in die Umgebung freigesetzt.

Nach der Zentrifugation bei 900 g wurde daher vor der Lyse der Zellen für den Histon-Elisa 100 µl des Zellüberstandes von jedem Well abgenommen und mit 100 µl der LDH-Reaktionslösung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß wurde die OD bei 490 nm gemessen.

2.2.21 Proteinbestimmung nach Bradford

Im Mittelpunkt dieser Proteinfärbung stehen blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden. In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillantblau G 250 von 465 zu 595 nm. Der Farbstoff bindet dabei unspezifisch an kationische und nicht polare, hydrophobe Seitenketten der Proteine.

Die Proteinbestimmung wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Zu 200 µl Bradford-Gebrauchsreagenz wurden je 5 µl des Standards oder der Probe pipettiert. Eine OD-Messung des blauen Reaktionsproduktes wurde nach 5 min bei 590 nm durchgeführt. Die Quantifizierung des zellulären Proteins erfolgte mit Hilfe einer mitgeführten Eichreihe.

2.2.22 Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Student's t-Test für paarige Stichproben. Als signifikant galten Werte von $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von *Helicobacter pylori*-Sonikat auf die Apoptoserate von AGS-Zellen

Um das quantitative Ausmaß der Apoptose zu ermitteln, wurden DNA-Fragmente in der cytoplasmatischen Fraktion von AGS-Zellen nach der Inkubation mit *Helicobacter pylori*-Sonikat aus Hp 87 mittels Histon Elisa bestimmt.

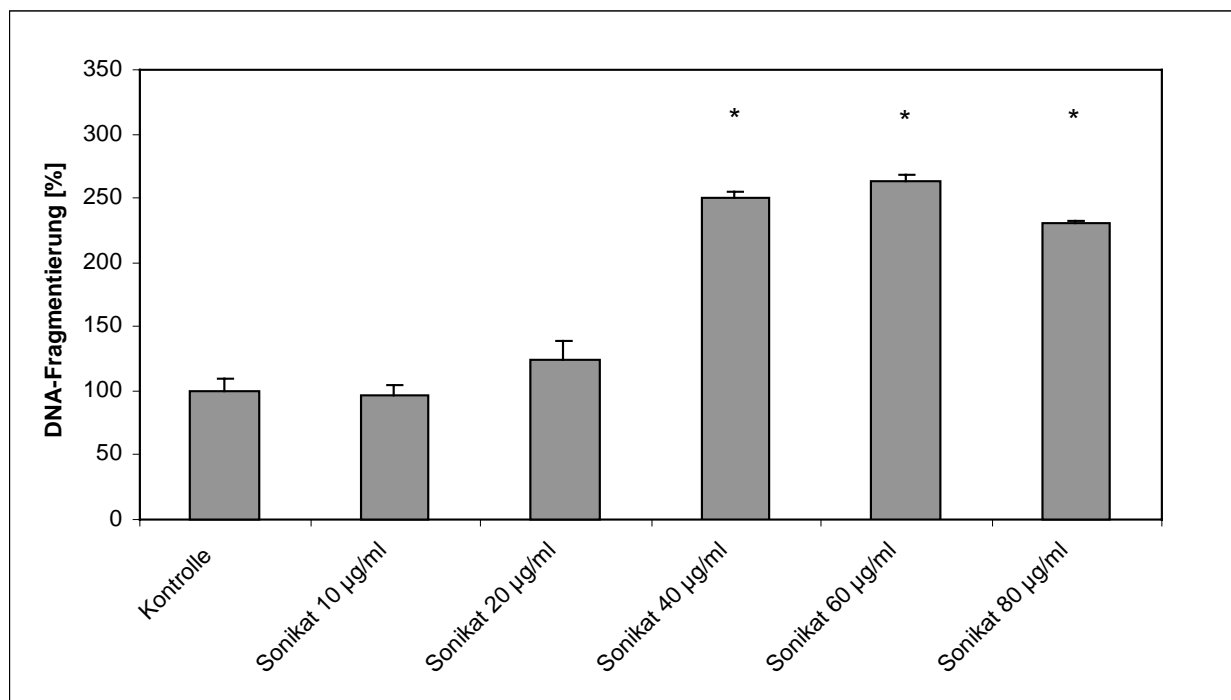


Abb. 3.1.1: Einfluß von *H. p.*-Sonikat auf die DNA-Fragmentierung in AGS-Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Sonikatkonzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Wie in Abb. 3.1.1 deutlich wird, war ein ausreichender Apoptosestimulus ab einer Sonikatkonzentration von 40 µg/ml gegeben. Der Gehalt der oligonukleosomalen Fragmente im Cytoplasma war im Vergleich zur Kontrolle doppelt so hoch. Daher wurde diese Konzentration für die folgenden Versuche eingesetzt, da höhere Sonikatkonzentrationen nicht in einer erhöhten DNA-Fragmentierung resultierten.

Ein weiterer Apoptosenachweis ist die Höchst 33324-Vitalfärbung, in der zusätzlich durch den Einsatz von Propidiumiodid zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden kann.

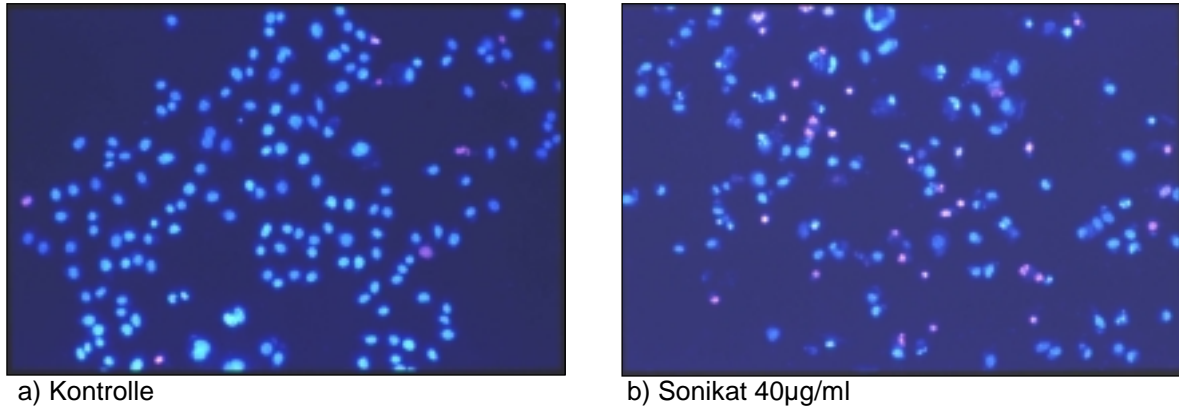


Abb. 3.1.2: Einfluß von *Helicobacter pylori* auf die Zellmorphologie von AGS-Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit der angegebenen Sonikatkonzentration in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Mikroskop.

Abb. 3.1.2 zeigt die morphologischen Veränderungen der Zellen durch die Inkubation mit *Helicobacter pylori*, die mit dem programmierten Zelltod einhergingen (Abb. 3.1.2 b). Sichtbar ist die Kondensation des Chromatins im früh-apoptotischen Stadium und die Bildung apoptotischer Körper. Im späteren Verlauf der Apoptose, nach dem Zusammenbruch der Membran, färbte das Propidiumiodid die DNA rot an.

Die Auszählung der vitalen und apoptotischen Zellen nach einer Fotoaufnahme unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ergab die in der folgenden Tabelle aufgeführten Ergebnisse.

	apoptotische Zellen [%]
Kontrolle	1,59 ± 0,42
Sonikat (40µg/ml)	7,44 ± 1,69 *

Tab. 3.1: Einfluß von *H. p.* 87-Sonikat auf die Anzahl vitaler und apoptotischer Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Sonikatkonzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Auszählung der apoptotischen Zellen unter dem Mikroskop. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM mit * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen.

Durch die Zugabe von 40 µg/ml *H. p.*-Sonikat war die Anzahl der apoptotischen Zellen gegenüber der Kontrolle 5-fach erhöht.

3.2 Vergleich der Wirkung von *Helicobacter pylori*-Sonikaten verschiedener Mutanten auf die Apoptoserate von AGS-Zellen

Da sowohl das vakuolisierende Zytotoxin VacA als auch das zytotoxinassoziierte Antigen CagA als Apoptose induzierende Komponenten diskutiert werden, wurden verschiedene Deletionsmutanten auf ihre Fähigkeit, den programmierten Zelltod auszulösen, getestet. Die DNA-Fragmente in der cytoplasmatischen Fraktion von AGS-Zellen wurden nach der Inkubation mit *Helicobacter pylori*-Sonikaten aus verschiedenen Stämmen mittels Histon Elisa bestimmt.

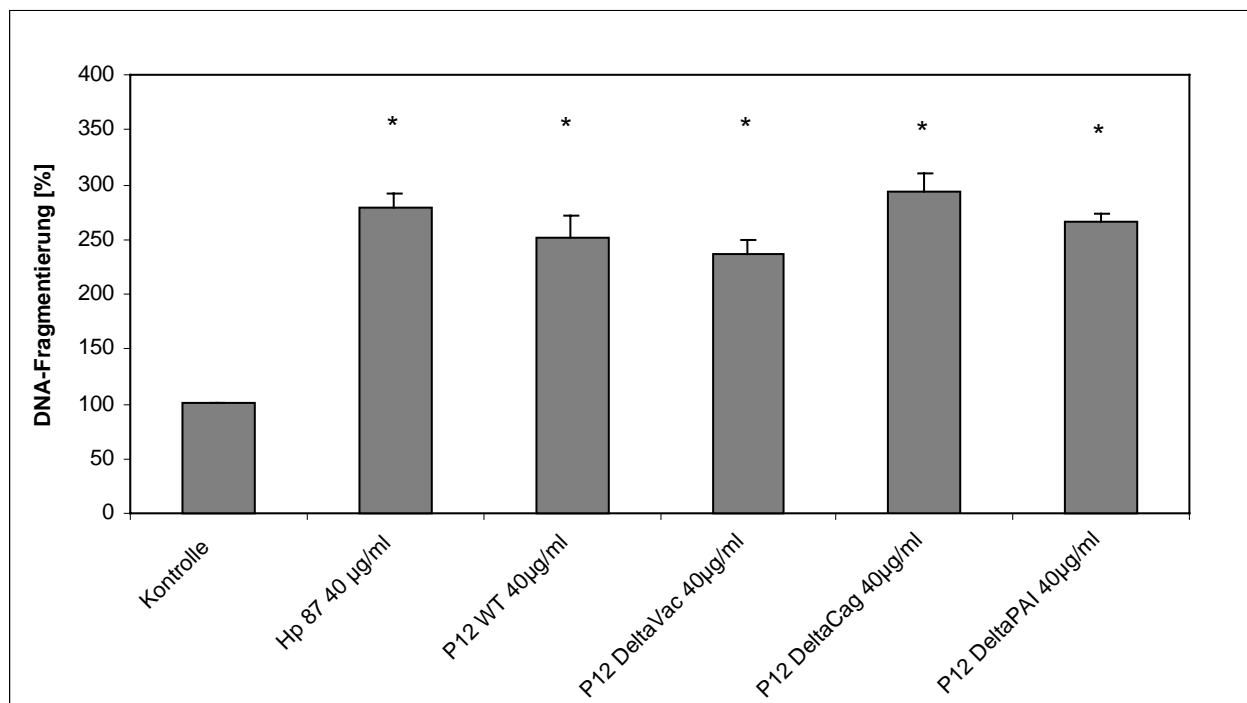


Abb. 3.2: Einfluß von verschiedenen *H. p.*-Mutanten auf die DNA-Fragmentierung in AGS-Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Sonikatkonzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Abb. 3.2 zeigt, daß zwischen VacA⁺/CagA⁺-Stämmen (*Hp* 87 und P12WT) und den Deletionsmutanten P12 Δ vacA (VacA⁻/CagA⁺), P12 Δ cagA (VacA⁺/CagA⁻) und P12 Δ PAI (Deletion der kompletten *cag*-Pathogenitätsinsel) keine Unterschiede in der DNA-Fragmentierung existieren. Alle Stämme steigerten die Apoptoserate signifikant um das 2–3-fache.

3.3 Ammoniumsulfatfällung des *Helicobacter pylori*-Sonikates

Nach der Ultrazentrifugation des *H. p.*-Sonikates wurde dessen apoptotische Aktivität im Überstand detektiert. Für eine unspezifische Abtrennung nicht-apoptotischer Proteine wurde das Zentrifugat einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dazu wurde das Sonikat mit Ammoniumsulfat verschiedener Konzentrationen versetzt und die Apoptose induzierende Wirkung des Präzipitates und des Überstandes mittels Histon Elisa in AGS-Zellen untersucht.

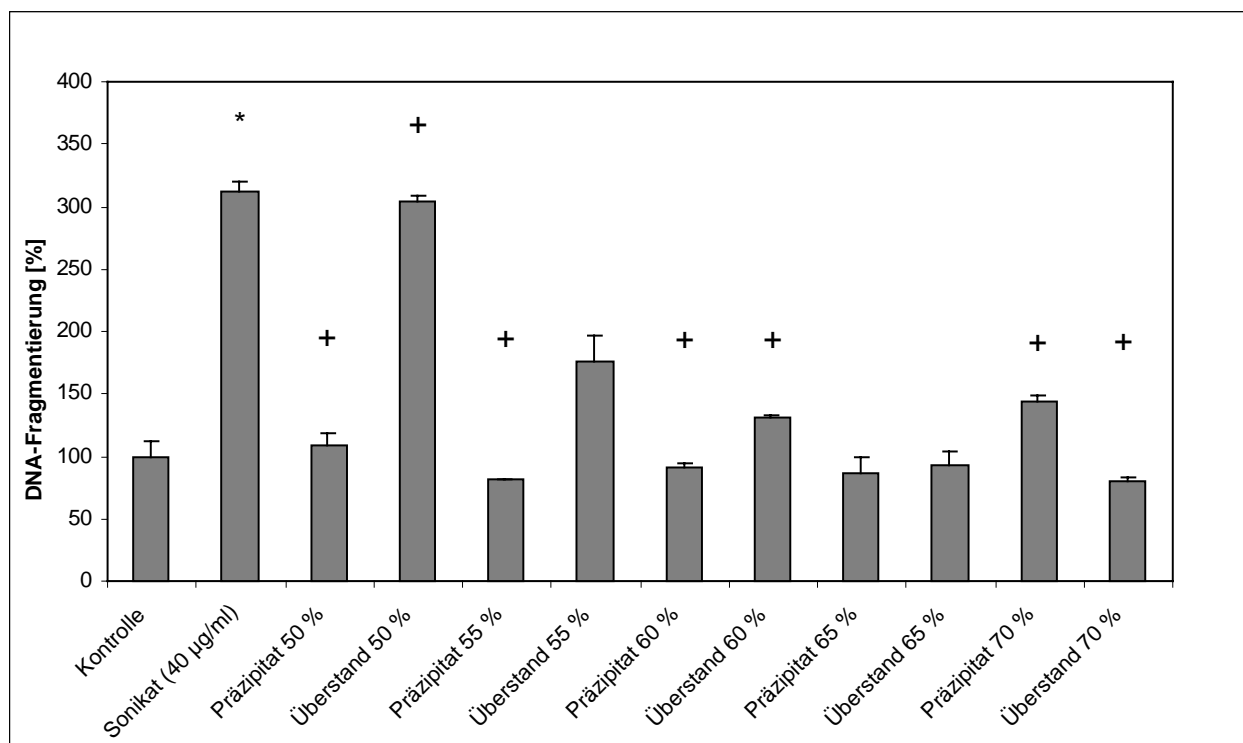


Abb. 3.3: Bestimmung der optimalen Ammoniumsulfat-Konzentration zur Ausfällung nicht-apoptotischer *H.p.*-Proteine. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 20 µl des Präzipitates oder des Überstandes der verschiedenen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Bis zu einer Konzentration von 50 % Ammoniumsulfat befand sich der Apoptose auslösende Faktor im Überstand (Abb. 3.3). Bei höheren Konzentrationen nahm die apoptotische Aktivität im Überstand ab.

Ein parallel durchgeführter Bradford-Test zeigte, daß sich bei 50 % Ammoniumsulfat-Sättigung je die Hälfte der Proteine im Überstand und im Präzipitat befanden.

Durch die Ammoniumsulfatfällung konnten daher 50 % nicht-apoptotisch wirksamer Proteine vom eingesetzten Protein abgetrennt werden.

3.4 Hitzefällung des *Helicobacter pylori*-Sonikats

Um eine weitere Abtrennung nicht-apoptotischer Proteine zu erlangen, wurde der Keim im Anschluß an die Ammoniumsulfatpräzipitation einer Hitzefällung unterzogen. Das Sonikat wurde durch Erhitzen bei verschiedenen Temperaturen gefällt und die Apoptose induzierende Wirkung des Überstandes nach Abzentrifugation der hitzelabilen Proteine mittels Histon Elisa in AGS-Zellen untersucht.

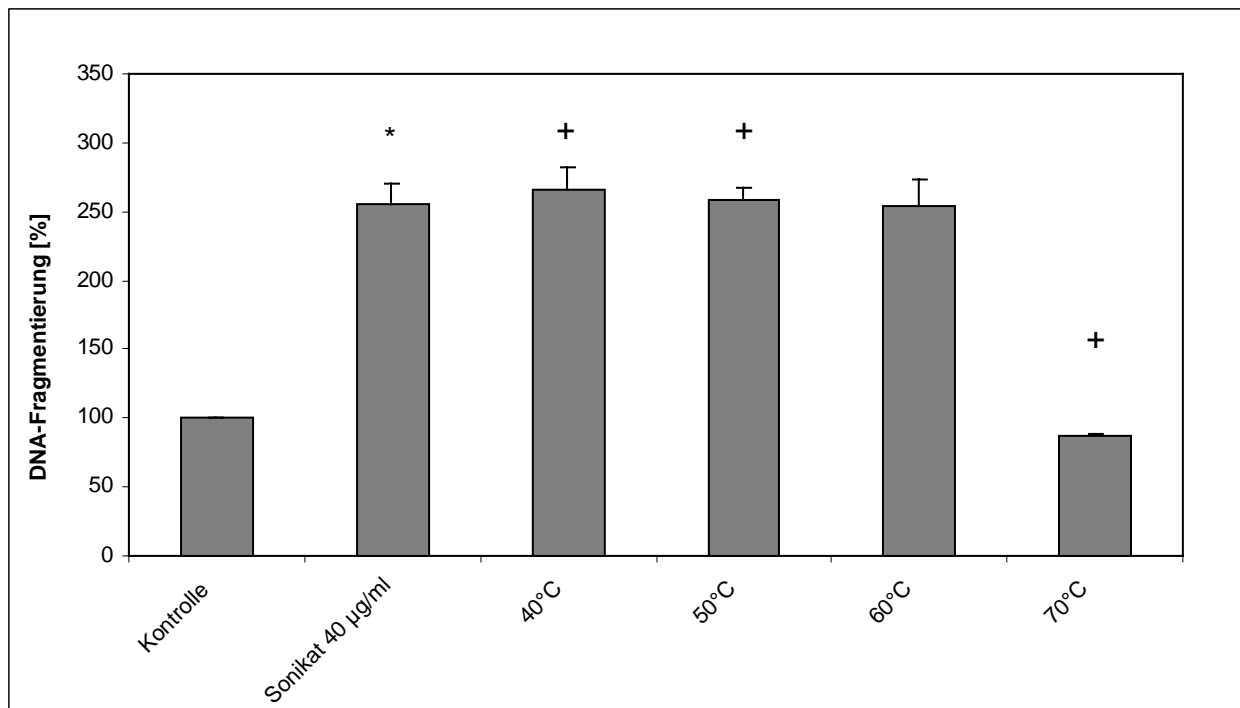


Abb. 3.4: Bestimmung der optimalen Temperatur zur Ausfällung nicht-apoptotischer *H.p.*-Proteine. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 50 µl des Überstandes nach Erhitzen des *H.p.*-Sonikats bei den angegebenen Temperaturen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Abb. 3.4 zeigt, daß sich das apoptoseauslösende *H. pylori*-Protein bis zu einer Temperatur von 60 °C im Überstand befand.

Ein parallel durchgeführter Bradfordtest zeigte, daß durch die Hitzefällung 50 % nicht-apoptotisch wirksamer Proteine vom eingesetzten Protein abgetrennt werden konnten.

3.5 Fällung des *H. p.*-Sonikats durch organische Lösungsmittel

Eine weitere Abtrennung nicht-apoptotischer Proteine wurde durch den Einsatz organischer Lösungsmittel wie Ethanol und Aceton erzielt. Dabei wurde das Sonikat im Anschluß an die Hitzefällung mit verschiedenen Konzentrationen an Ethanol und Aceton versetzt, die gefällten Proteine abzentrifugiert und die Überstände mittels Histon Elisa in AGS-Zellen auf ihre Apoptose induzierende Wirkung untersucht.

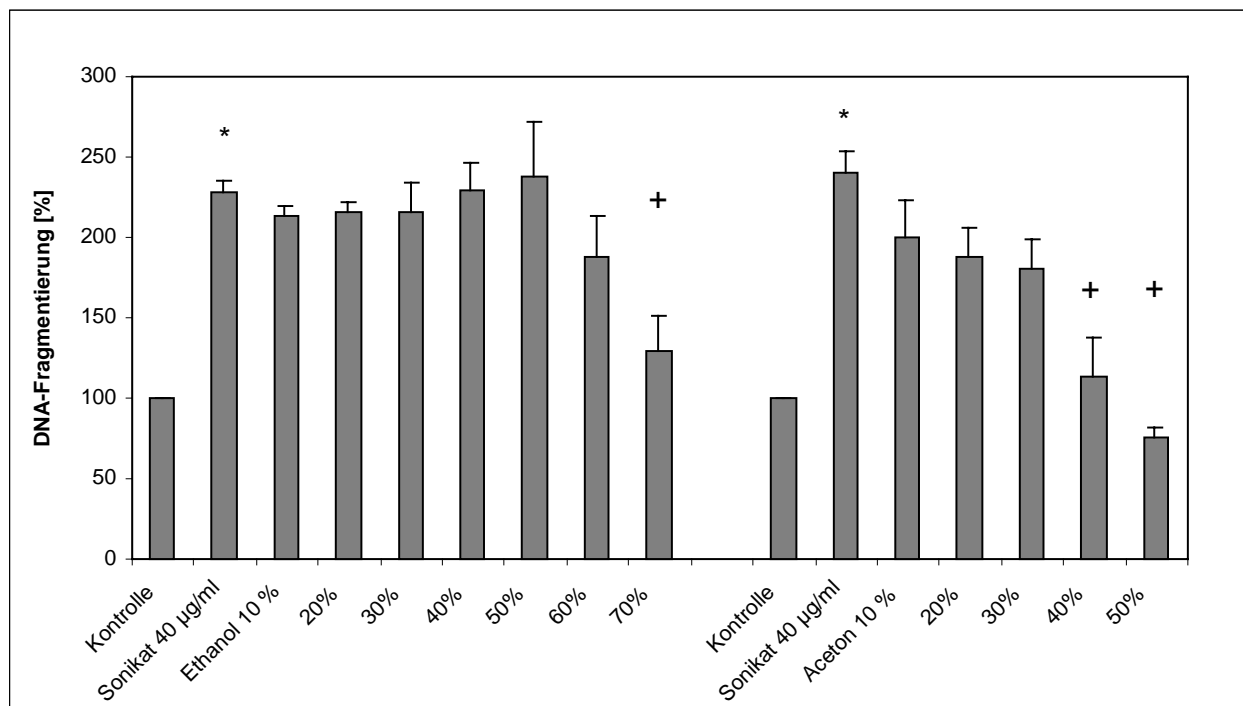


Abb. 3.5: Bestimmung der optimalen Ethanol- bzw. Aceton-Konzentration zur Ausfällung nicht-apoptotischer *H.p.*-Proteine. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 50 µl des Überstandes bei den angegebenen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Bis zu einer Ethanol-Konzentration von 50 % und einer Aceton-Konzentration von 30 % befand sich der Apoptose auslösende Faktor des Keims im Überstand (Abb. 3.5). Bei höheren Konzentrationen nahm die apoptotische Aktivität im Überstand ab.

Ein parallel durchgeführter Bradfordtest zeigte, daß durch die Fällung 90 % nicht-apoptotisch wirksamer Proteine vom eingesetzten Protein abgetrennt werden konnten.

3.6 Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität des Apoptose-Faktors von *Helicobacter pylori*

Zur Bestimmung des optimalen pH-Bereiches, in dem die Aktivität des apoptotischen Faktors von *H. pylori* die maximale Wirkung erzielt, wurde das Sonikat mit 1 M HCl und 1 M NaOH auf pH-Werte von 1-13 eingestellt, die gefällten Proteine abzentrifugiert und die Überstände auf AGS-Zellen gegeben. Die Apoptose induzierende Wirkung wurde mittels Histon Elisa untersucht.

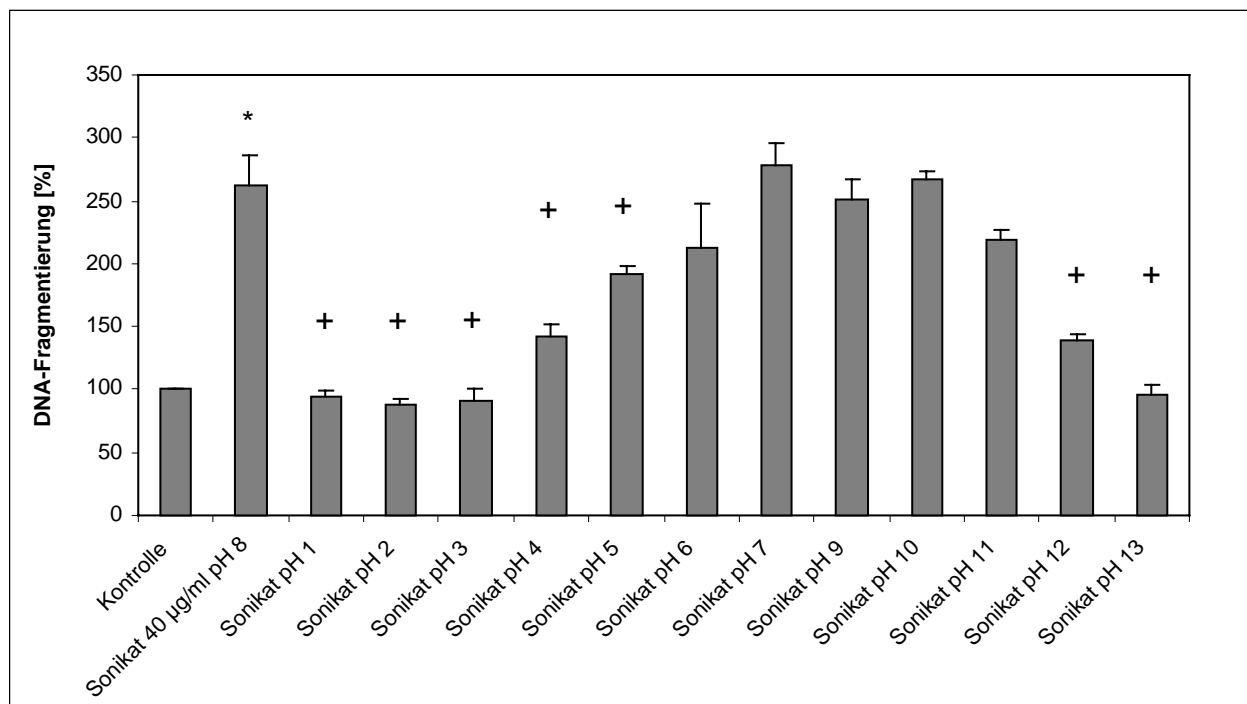


Abb. 3.6: Bestimmung des optimalen pH-Bereiches des apoptotischen Faktors von *Helicobacter pylori*. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 50 µl des Überstandes bei den angegebenen pH-Werten in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Der optimale pH-Bereich des Apoptose auslösenden Faktors des Bakteriums lag zwischen pH 6 – pH 11 (Abb. 3.6). Unterhalb bzw. oberhalb dieses Bereiches nahm die Aktivität des Faktors ab. Ab pH 3 bzw. pH 13 war keine apoptotische Aktivität meßbar.

3.7 Fällung des *H. p.*-Sonikats durch Polyethylenglycol

Eine Möglichkeit zur Abtrennung von Proteinen ist die Fällung mit Polyethylenglycol. Zur weiteren Aufreinigung des Apoptose induzierenden Proteins wurde dieses mit verschiedenen PEG-8000-Konzentrationen versetzt, die gefällten Proteine abzentrifugiert und die Überstände auf AGS-Zellen gegeben. Die Apoptose induzierende Wirkung wurde mittels Histon Elisa untersucht.

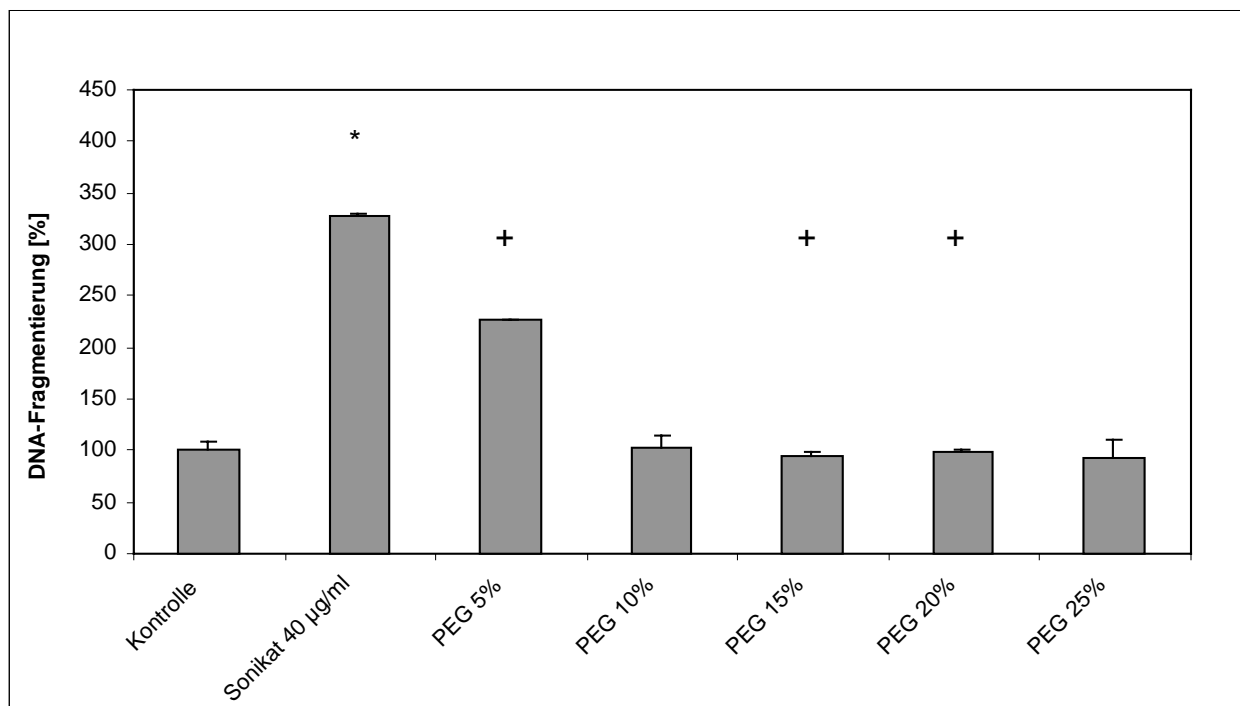


Abb. 3.7: Bestimmung der optimalen PEG-Konzentration zur Ausfällung nicht-apoptotischer *H.p.*-Proteine. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 50 µl des Überstandes bei den angegebenen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Bis zu einer PEG-Konzentration von 5 % befand sich der Apoptose auslösende Faktor im Überstand (Abb. 3.7). Bei dieser Konzentration konnten nach dem Bradford-Test 15 %

apoptotisch nicht wirksamer Proteine vom Gesamtprotein abgetrennt werden. Bei höheren Konzentrationen nahm die apoptotische Aktivität im Überstand ab.

Durch einen weiteren Fällungsversuch mit Harnstoff (Ergebnisse nicht gezeigt) konnte keine Proteinpräzipitation erzielt werden.

3.8 Bestimmung der molekularen Masse des Apoptose induzierenden Faktors von *Helicobacter pylori* durch Ausschlußchromatographie

Das ultrazentrifugierte, durch Ammoniumsulfat und Hitze gefällte *H. p.*-Sonikat wurde zur Bestimmung der molaren Masse des Apoptose induzierenden Faktors einer Gelfiltration unterzogen. Die Eluate wurden mit AGS-Zellen inkubiert und die apoptotische Aktivität mittels Histon Elisa detektiert.

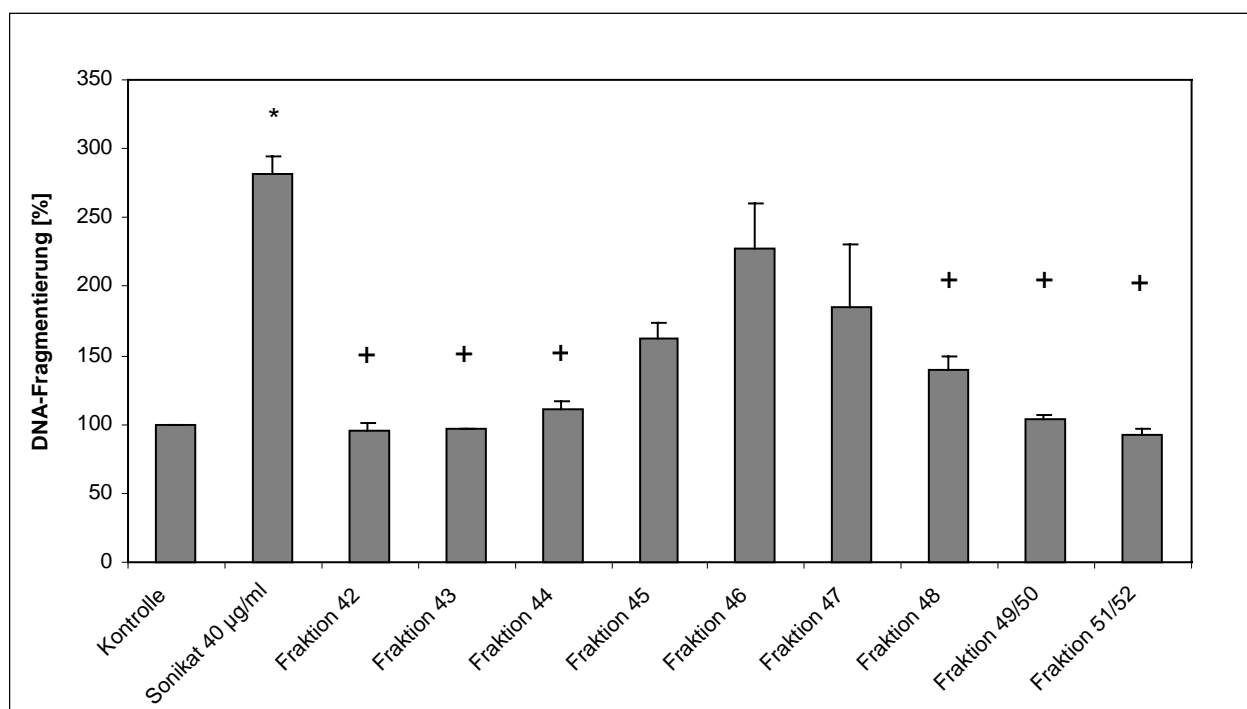


Abb. 3.8.1: Bestimmung der molekularen Masse des *H. p.*-Sonikats mittels Gelfiltration (Fractogel® EMD Bio-SEC-Säule der Firma Merck). AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 100 µl der eluierten Fraktionen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Abb. 3.8.1 zeigt die Elution des apoptotischen Faktors nach 45 bis 47 ml mit einem Maximum bei 46 ml.

Die molare Masse des gesuchten Proteins konnte anhand von Proteinen mit bekannter molarer Masse ermittelt werden: (Amylase 200 kDa (41,2 ml), ADH 150 kDa (42 ml), BSA 66 kDa (44,4 ml) Carbonanhydrase 29 kDa (54 ml), Cytochrom c 12,4 kDa (63,4 ml)).

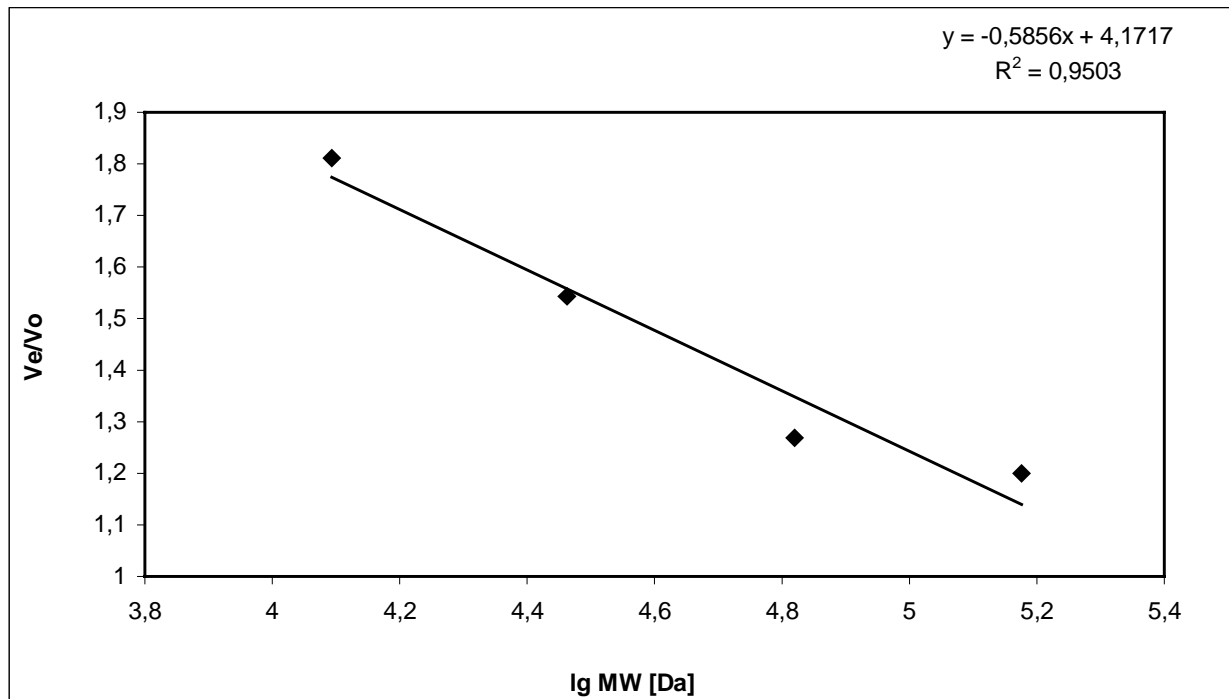


Abb. 3.8.2: Bestimmung der molekularen Masse von *H. p.*-Sonikat mittels linearer Regression: Aufgetragen wurden auf der x-Achse die Logarithmen der molaren Massen gegen die Elutionsvolumina, dividiert durch das Ausschlußvolumen der Säule (35 ml) auf der y-Achse. Anhand der im Diagramm dargestellten Formel für die lineare Regression konnte mit dem Elutionsvolumen des apoptotischen Faktors auch dessen Molmasse bestimmt werden.

Nach Berechnung der linearen Regression anhand Abb. 3.8.2 lag die Molmasse des apoptotischen Faktors zwischen 68 und 85 kDa.

Die drei Apoptose auslösenden Fraktionen wurde vereint und der Proteinanteil mittels Bradfordtest bestimmt. Der Proteingehalt des abgetrennten Faktors am Gesamtprotein betrug 20-25 %. Die Fractogel-Gelfiltrations-Säule erzielte somit eine 4-5-fache Aufreinigung.

Durch die Verwendung von Säulenmaterial mit schärferer Trennleistung (Sephacryl 200 S) sollte der Molekulargewichtsbereich weiter eingegrenzt werden.

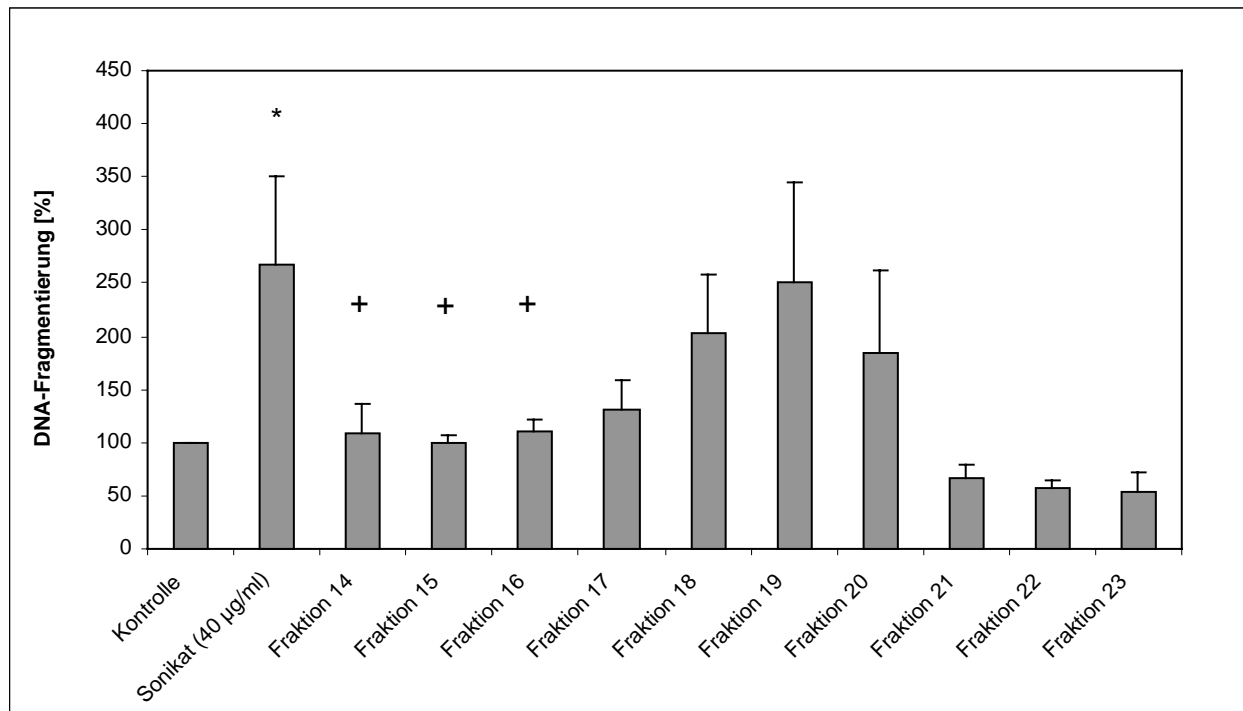


Abb. 3.8.3: Bestimmung der molekularen Masse des *H. p.*-Sonikat mittels Gelfiltration (Sephacryl S200). AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 100 µl der eluierten Fraktionen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Abb. 3.8.3 zeigt die Elution des apoptotischen Faktors nach 18 bis 20 ml mit einem Maximum bei 19 ml.

Die molare Masse des gesuchten Proteins konnte anhand von Proteinen mit bekannter molarer Masse ermittelt werden: (Amylase 200 kDa (15 ml), ADH 150 kDa (17,2 ml), BSA 66 kDa (18,8 ml) Carbonanhydrase 29 kDa (22,5 ml), Cytochrom c 12,4 kDa (25,2 ml)).

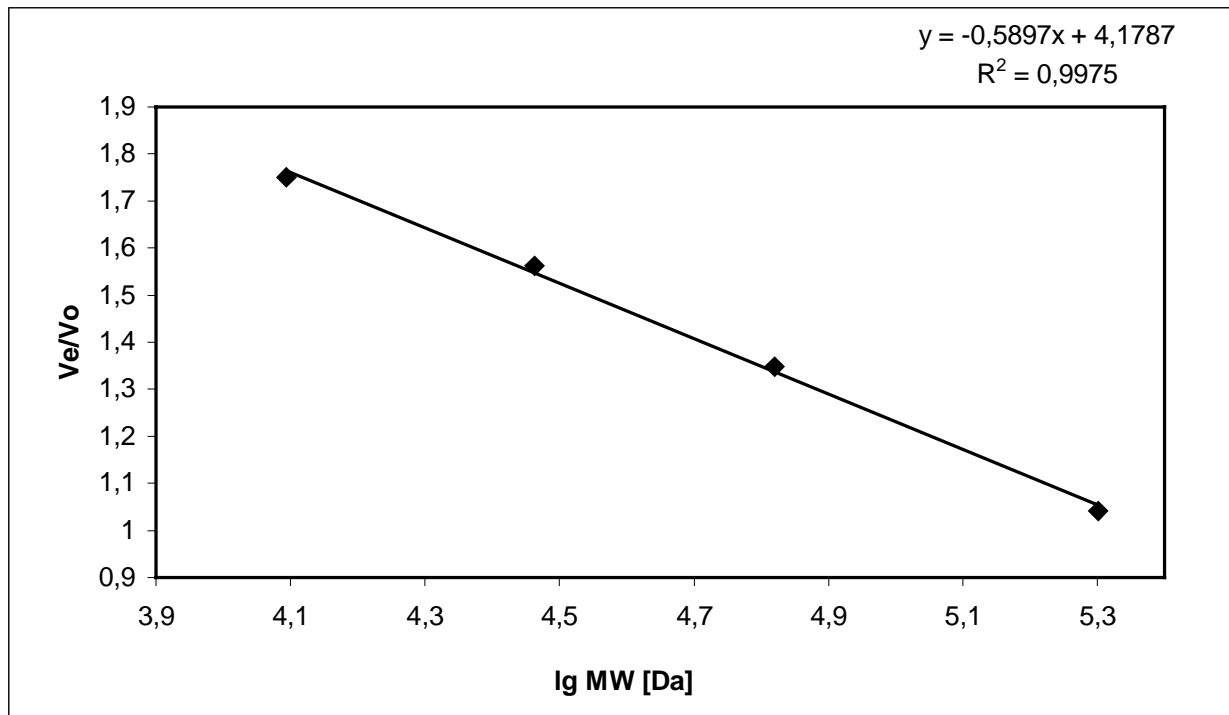


Abb. 3.8.4: Bestimmung der molekularen Masse von *H. p.*-Sonikat mittels linearer Regression: Aufgetragen wurden auf der x-Achse die Logarithmen der molaren Massen gegen die Elutionsvolumina, dividiert durch das Ausschlußvolumen der Säule (14,4 ml) auf der y-Achse. Anhand der im Diagramm dargestellten Formel für die lineare Regression konnte mit dem Elutionsvolumen des apoptotischen Faktors auch dessen Molmasse bestimmt werden.

Nach Berechnung der linearen Regression anhand Abb. 3.8.4 lag die Molmasse des apoptotischen Faktors zwischen 42 und 73 kDa.

Der Proteingehalt der Lösung aus den drei vereinten Apoptose auslösenden Fraktionen wurde mittels Bradfordtest bestimmt. Dessen Anteil betrug 25-30 %. Die Sephacryl-Gelfiltrations-Säule erzielte somit eine ca. 4-fache Aufreinigung.

3.9 Verteilung der apoptotischen Aktivität von *Helicobacter pylori* nach Aufreinigung über Hydrophobizitäts-Chromatographie

Das ultrazentrifugierte, durch Ammoniumsulfat und Hitze gefällte *H. p.*-Sonikat wurde über eine Hydrophobizitäts-Säule aufgereinigt. Die Eluate wurden in 2 ml-Fractionen aufgefangen, mit AGS-Zellen inkubiert und die apoptotische Aktivität mittels Histon Elisa detektiert.

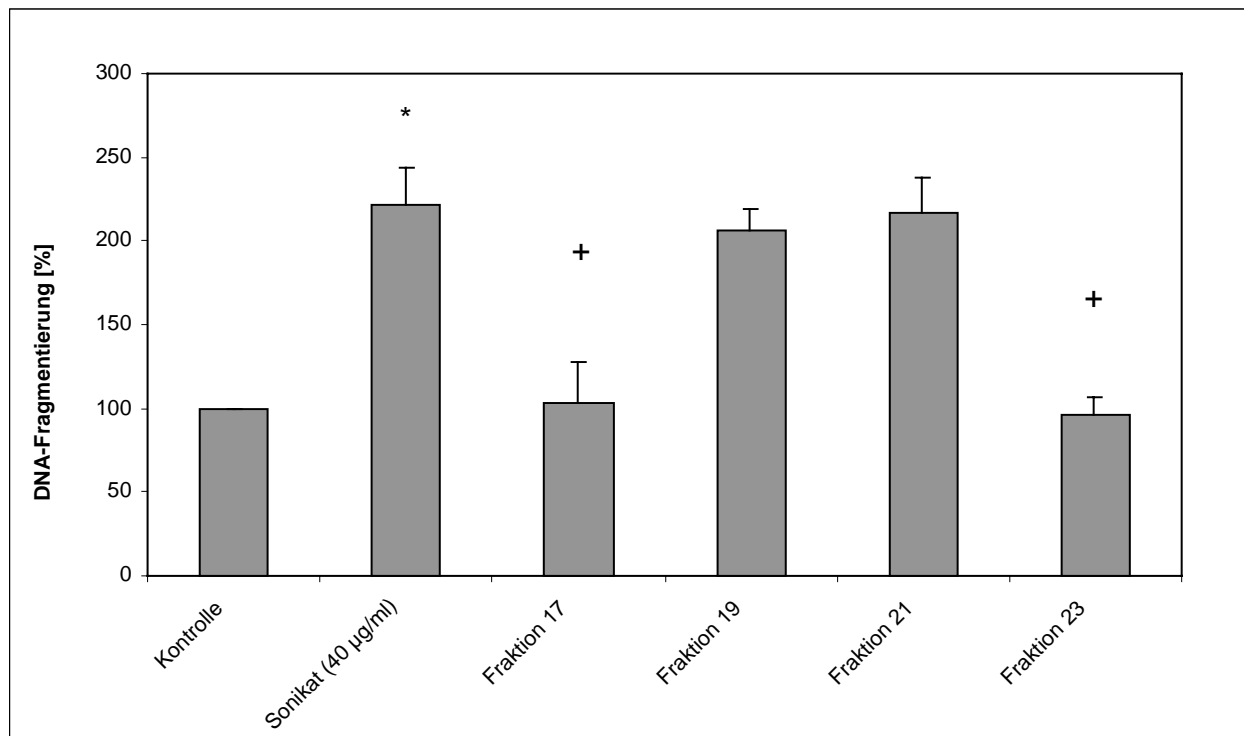


Abb. 3.9: Ermittlung der apoptotisch aktiven Fraktion aus Hydrophobizitäts-Läufen. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 100 µl der eluierten Fraktionen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

In Abb. 3.9 zeigt sich eine deutliche Anreicherung des apoptotischen Faktors in Fraktion 19 und 21. Die Elution des Faktors erfolgte bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 1–0,88 M.

Die zwei Apoptose auslösenden Fraktionen wurden vereint. Der Proteingehalt der Lösung, in der sich der abgetrennte Faktor befand, wurde mittels Bradfordtest bestimmt. Dessen Anteil betrug 10-15%. Die Hydrophobizitäts-Säule erzielte somit eine bis zu 10-fache Aufreinigung.

3.10 Verteilung der apoptotischen Aktivität von *Helicobacter pylori* nach Aufreinigung über Hydroxylapatit

Eine weitere Aufreinigung wurde durch eine Hydroxylapatit-Säule erreicht. Die Eluate des ultrazentrifugierten, durch Ammoniumsulfat und Hitze gefällten und nach der Hydrophobizitäts-Chromatographie aufkonzentrierten *H. p.*-Sonikats wurden in 2 ml-Fraktionen aufgefangen, mit AGS-Zellen inkubiert und die apoptotische Aktivität mittels Histon Elisa detektiert.

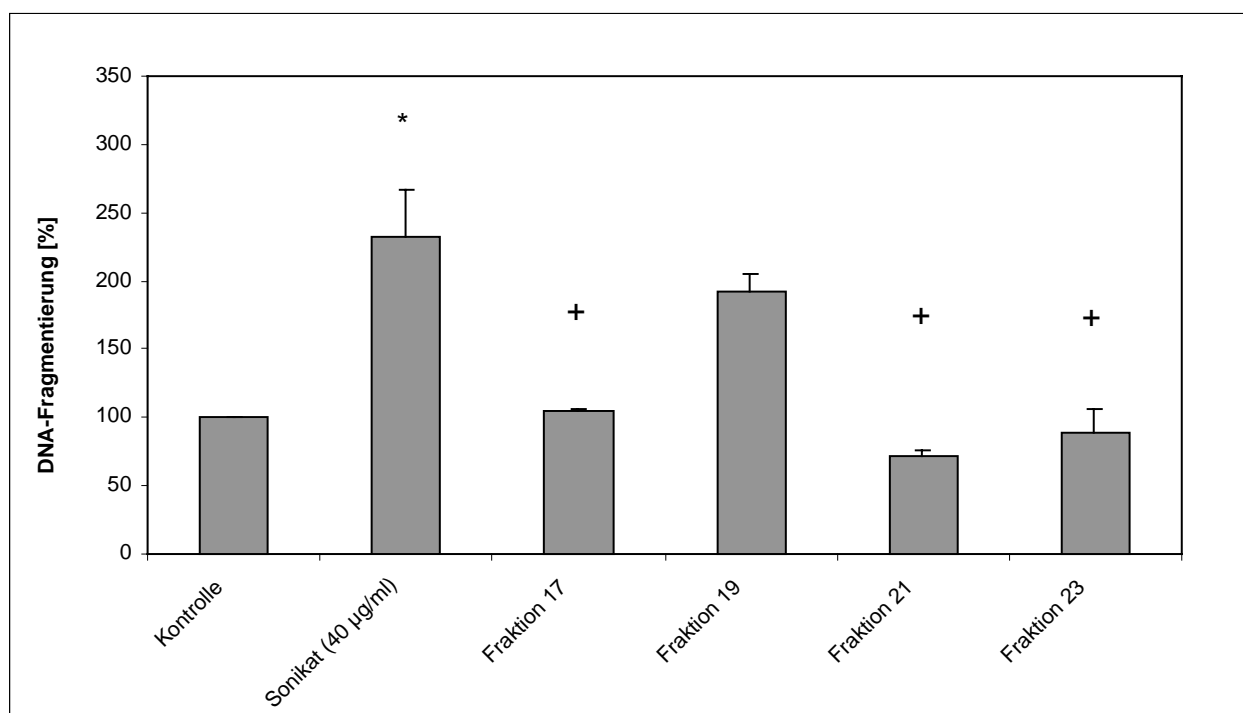


Abb. 3.10: Ermittlung der apoptotisch aktiven Fraktion aus Hydroxylapatit-Läufen. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit 100 µl der eluierten Fraktionen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

In Abb. 3.10 zeigt sich eine deutliche Anreicherung des apoptotischen Faktors in Fraktion 19. Die Elution des Faktors erfolgte bei einer Phosphatkonzentration von 235-290 mM und einer Chloridkonzentration von 1 M.

Der Proteinanteil des abgetrennten Faktors am Gesamtprotein, dessen Gehalt mittels Bradfordtest bestimmt wurde, betrug 10-15%. Die Hydroxylapatit-Säule erzielte somit eine bis zu 10-fache Aufreinigung.

3.11 Urease-Aktivitätsbestimmung

Die keimeigene Urease soll nach Fan et al. (2000) zur DNA-Fragmentierung in Magenepithelzellen beitragen.

Um zu überprüfen, ob die Urease-Aktivität im Sonikat nach den einzelnen Aufreinigungsschritten noch vorhanden war, wurde die Urease-Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen bei RT und einer OD von 556 nm bestimmt. Durch die Bestimmung der Anfangssteigung, konnte die Absorptionsänderung $\Delta E/\text{min}$ (Reaktionsgeschwindigkeit) ermittelt werden. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m wurde durch doppelt reziproke Auftragung der Substratkonzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit in einem Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelt.

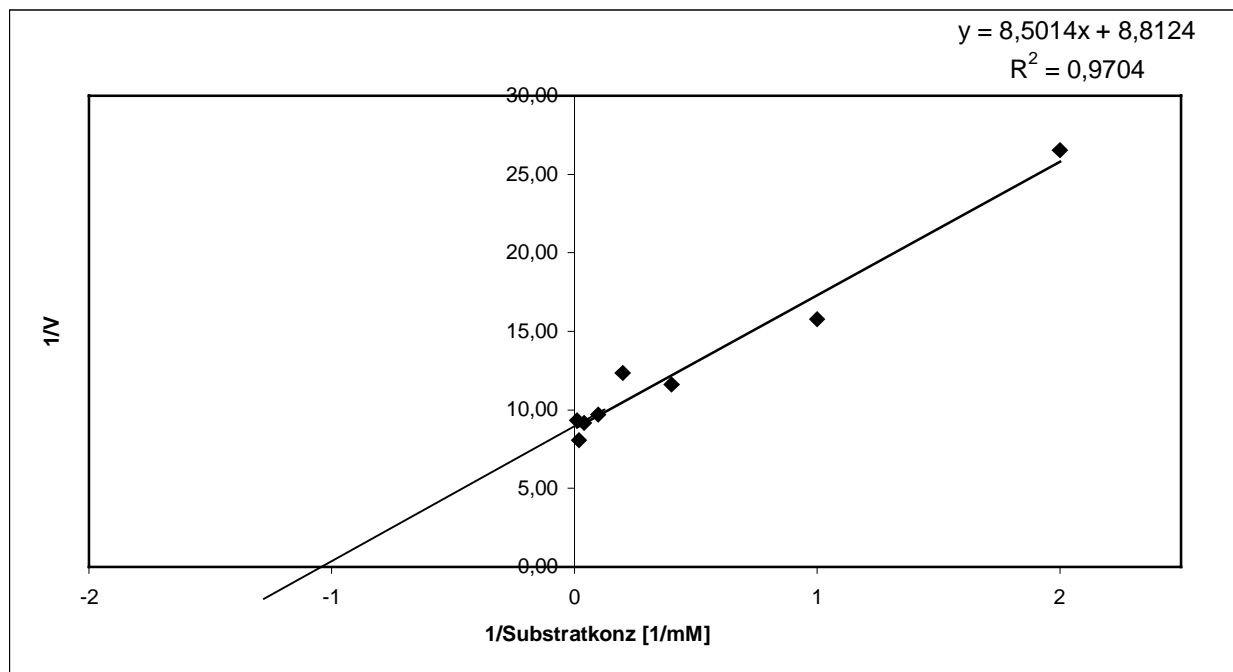


Abb. 3.11.1: Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m von *H. p.*-Sonikat nach Ultrazentrifugation mittels linearer Regression: Aufgetragen wurden auf der x-Achse die reziproken Substratkonzentrationen gegen die reziproke Reaktionsgeschwindigkeiten auf der y-Achse. Anhand der im Diagramm dargestellten Formel für die lineare Regression konnte K_m bestimmt werden.

Anhand der linearen Regression von Abb. 3. 11.1 konnte der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse, der $-1/K_m$ darstellt, und somit K_m berechnet werden. Der Wert der Michaelis-Konstanten für das *H.p.*-Sonikat nach der Ultrazentrifugation betrug danach 0,96 mM.

Nach dem gleichen Verfahren wurden auch die Michaelis-Konstanten für das *H.p.*-Sonikat nach der Ultrazentrifugation, Salz- und Hitzefällung und hydrophober Interaktionschromatographie bestimmt. Die Werte für die einzelnen Konstanten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Aufreinigungsstufe	K_m [mM]
Uz	0,96
Uz + Salz-/Hitzefällung	0,27
Uz + Salz-/Hitzefällung+ HIC	0,31

Tab. 3.11: Michaelis-Menten-Konstante K_m von *H. p.*-Sonikat nach verschiedenen Aufreinigungsstufen.

In Tabelle 3.11. zeigt sich eine deutliche Abnahme der Urease-Aktivität bereits nach dem ersten Aufreinigungsschritt. Die Aktivität blieb nach einem weiteren Aufreinigungsschritt konstant.

3.12 Wirkung von Ammoniak und *Helicobacter pylori*-Sonikat in Verbindung mit Harnstoff auf die Apoptoserate von AGS-Zellen

Da die Produktion von Ammoniak durch die keimeigene Urease an der Induktion des programmierten Zelltods beteiligt sein soll, wurde untersucht, ob die Aktivität der Urease durch Koinkubation von *Helicobacter pylori*-Sonikat mit Harnstoff zur DNA-Fragmentierung in Magenepithelzellen beiträgt. Die apoptotische Aktivität wurde mittels Histon Elisa detektiert.

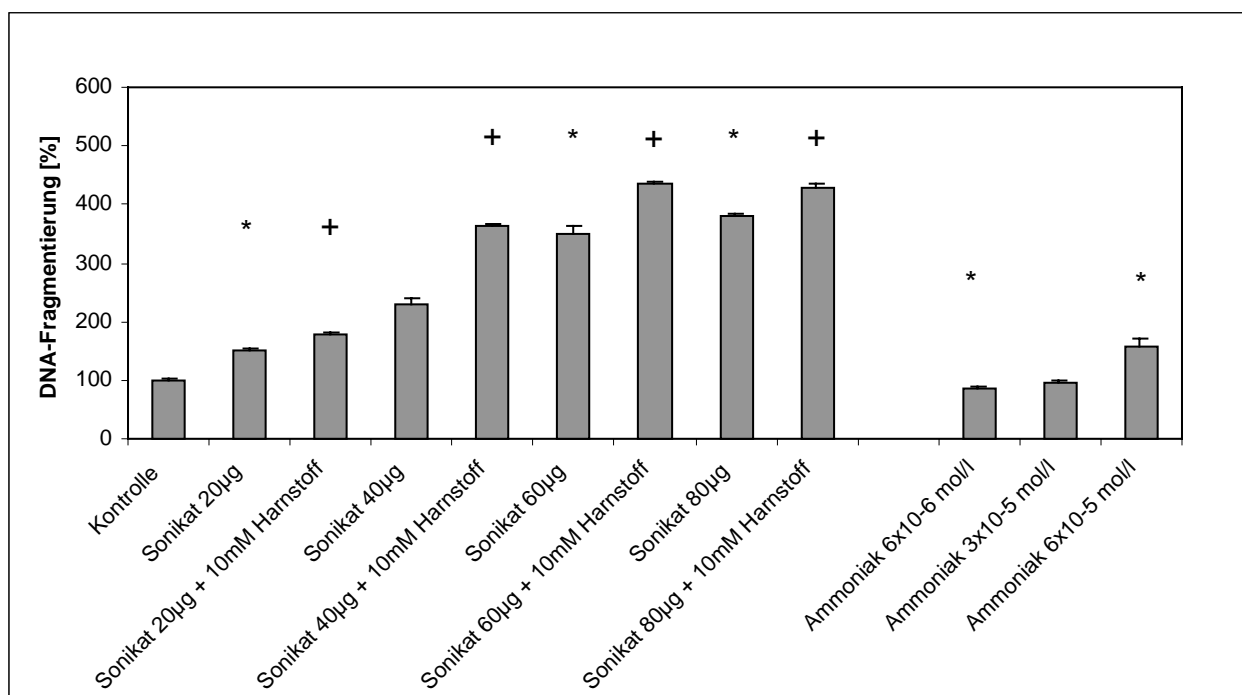


Abb. 3.12: Bestimmung der apoptotischen Aktivität von *H. p.* in Verbindung mit Harnstoff. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Mengen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Die Koinkubation von *H. pylori*-Sonikat mit Harnstoff erhöhte die Apoptoserate im Vergleich zum Sonikat (Abb. 3.12). Bei niedrigen und hohen Sonikatkonzentrationen fiel die Erhöhung der DNA-Fragmentierung gering aus. Im Vergleich zu 40 µg bzw. 60 µg Sonikat konnte die Apoptoserate durch die Zugabe von Harnstoff um 137 % bzw. 74 % gesteigert werden.

Die Inkubation von AGS-Zellen mit Ammoniak resultierte ab einer NH_3 -Konzentration von 60 μM in einer Erhöhung des Zelltodes um 60 %, ab 300 μM jedoch waren die Zellen im parallel durchgeführten Zytotoxizitätstest nekrotisch (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.13 Extraktion von *Helicobacter pylori*-LPS

Bakterielle Lipopolysaccharide werden als ein Induktor der Apoptose diskutiert. Daher wurden diese mittels Phenol-Extraktion aus *Helicobacter pylori* isoliert und mit AGS-Zellen inkubiert. Die apoptotische Aktivität wurde mittels Histon Elisa detektiert.

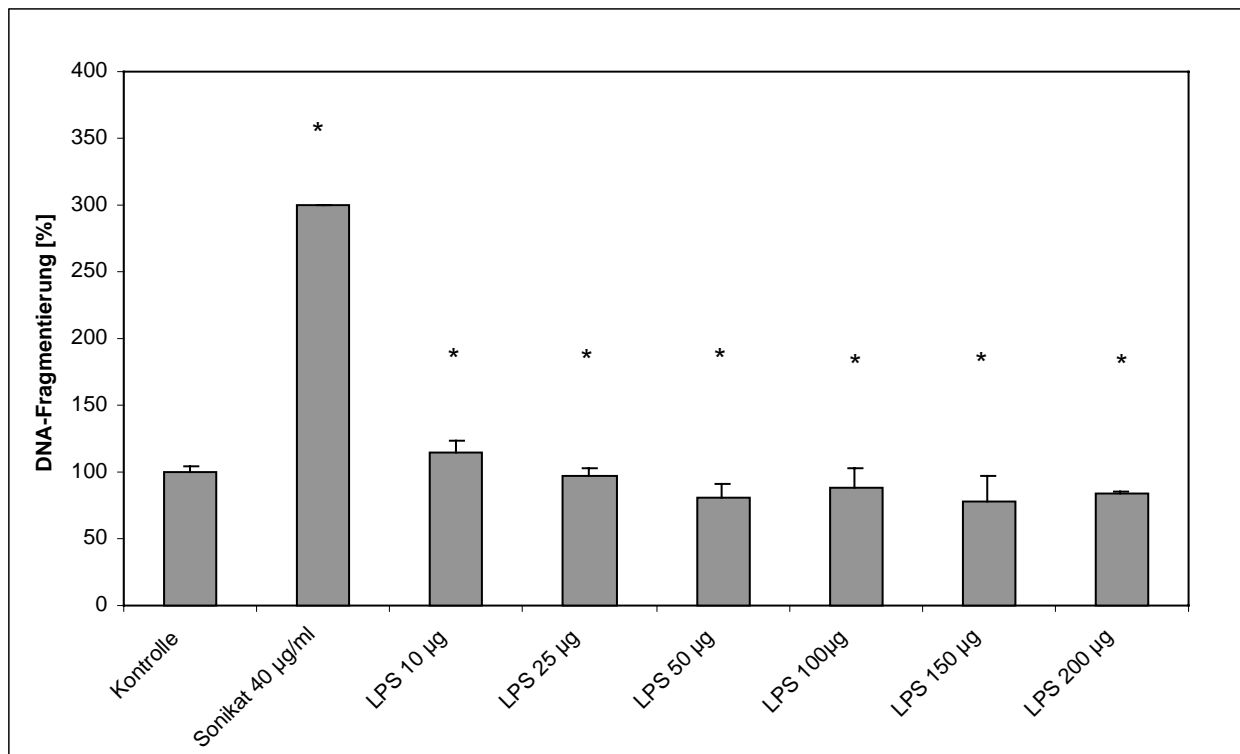


Abb. 3.13: Bestimmung der apoptotischen Aktivität von *H. p.*-LPS. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen LPS-Mengen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Wie in Abb. 3.13 zu erkennen ist, trug das *Helicobacter pylori*-LPS nicht zur DNA-Fragmentierung bei. Die Inkubation mit 10–200 μg der aus dem Keim extrahierten LPS bewirkten in der Zelllinie AGS keinerlei Apoptose. Auch in einer weiteren Zelllinie HM02 (Ergebnisse nicht gezeigt) ließen sich keine Effekte durch LPS erzielen.

3.14 Extraktion von *Helicobacter pylori*-Sphingomyelinasen

Da *H. pylori*-SMasen als ein Induktor der Apoptose diskutiert werden, wurden diese nach Lin et al. (1998) aus *Helicobacter pylori* extrahiert und mit AGS-Zellen inkubiert. Die apoptotische Aktivität wurde mittels Histon Elisa detektiert.

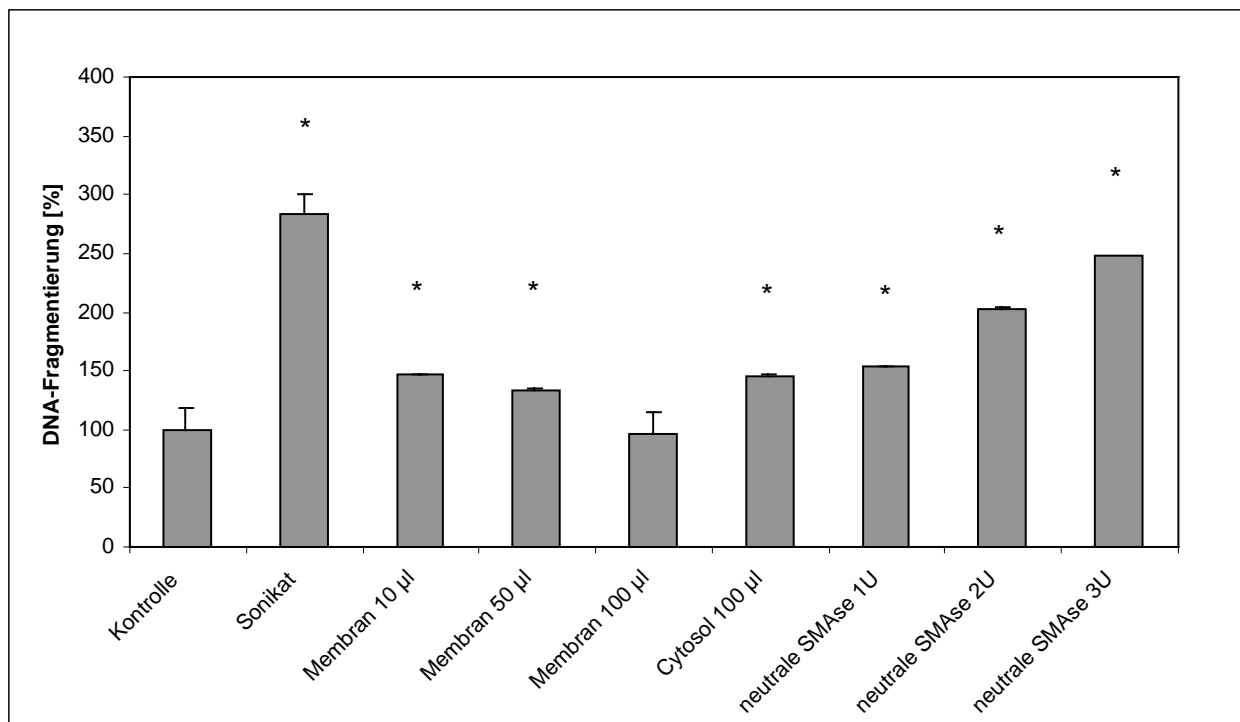
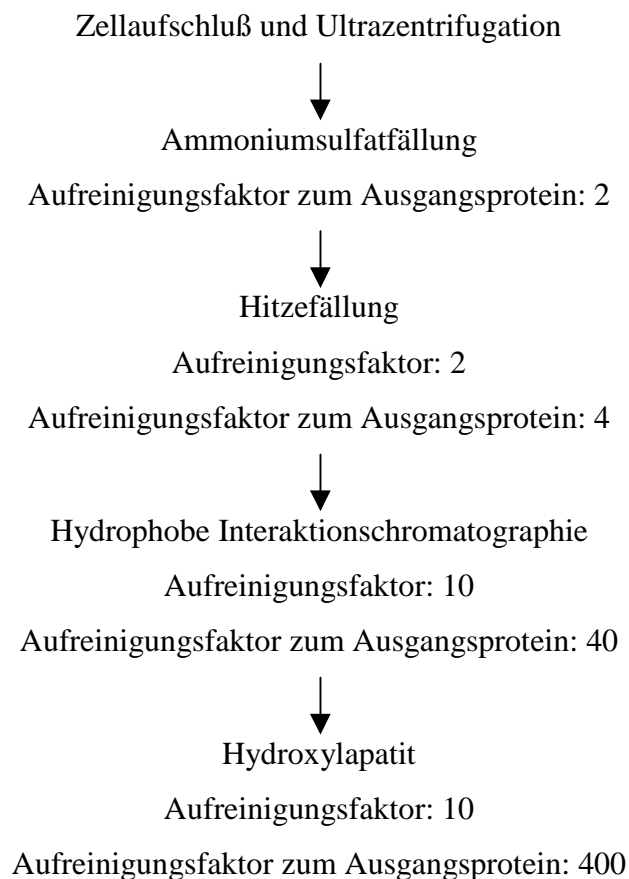


Abb. 3.14: Bestimmung der apoptotischen Aktivität von *H. p.*-SMasen. AGS-Zellen wurden 24 Stunden mit den angegebenen Mengen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Abb. 3.14 zeigt, daß sowohl die Membranfraktion, die die neutralen, als auch die cytosolische Fraktion, die die sauren SMasen enthielt, nicht in der Lage waren, in AGS-Zellen Apoptose auszulösen. Dagegen war ab 2 Units einer käuflich erworbenen SMase eine 2-fache Erhöhung der DNA-Fragmentierung zu verzeichnen.

3.15 Gelelektrophoretische Auftrennung der *Helicobacter pylori*-Proteine

Das *Helicobacter pylori*-Sonikat wurde gemäß der folgenden Aufreinigungsstrategie angereichert.



Die apoptotisch aktiven Fraktionen aus verschiedenen Aufreinigungsstufen wurden durch native und denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

3.15.1 Auftrennung durch denaturierende Gelelektrophorese

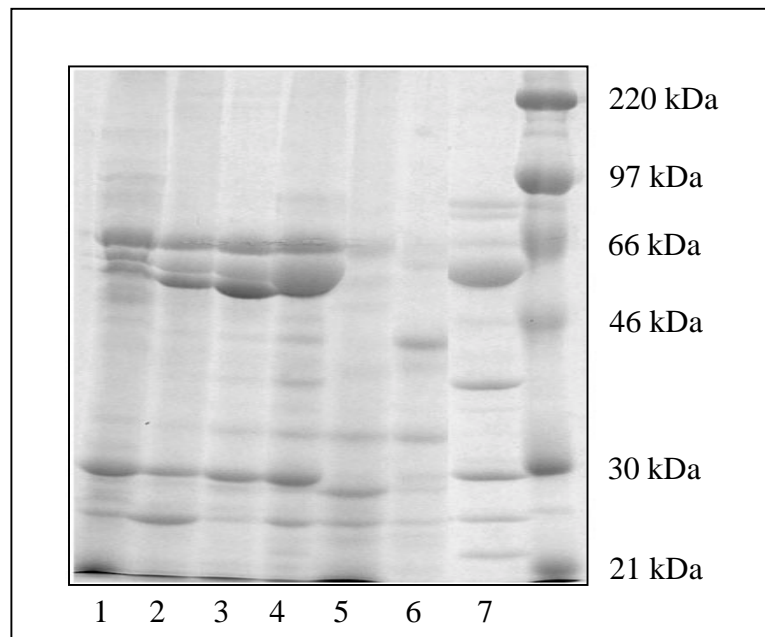


Abb. 3.15.1: Denaturierende gelelektrophoretische Auftrennung des *Helicobacter pylori*-Sonikats nach verschiedenen Aufreinigungsstufen. Die Proben wurden nach Wessel und Flüge gefällt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen; das Gel wurde im Anschluß mit Coomassie G250 gefärbt. Die einzelnen Aufreinigungsstufen wurden mit 1 – 7 gekennzeichnet.

1:Uz

2: Uz / Salzfällung

3: Uz / Salz- / Hitze-fällung

4: Uz / Salz- / Hitze-fällung / HIC

5: Uz / Salz- / Hitze- / Ethanol-fällung; inaktive Fraktion

6: Uz / Salz- / Hitze-fällung / HIC / HAP; inaktive Fraktion

7: Uz / Salz- / Hitze-fällung / HIC / HAP

Abb. 3.15.1 zeigt das *Helicobacter pylori*-Sonikat nach verschiedenen Aufreinigungsstufen. Nach bereits vier Aufreinigungsschritten (Ultrazentrifugation, Salz- und Hitze-fällung und hydrophobe Interaktionschromatographie: s. Bahn 4) ist die Anreicherung einer Bande bei 60 kDa deutlich zu erkennen. Diese Bande war in apoptotisch inaktiven Fraktionen nicht vorhanden (Bahn 5 und 6). Nach einer weiteren Aufreinigung über eine Hydroxylapatit-Säule (Bahn 7) konnten neben der 60 kDa-Bande noch 7 weitere Banden identifiziert werden.

3.15.2 Auftrennung durch native Gelelektrophorese

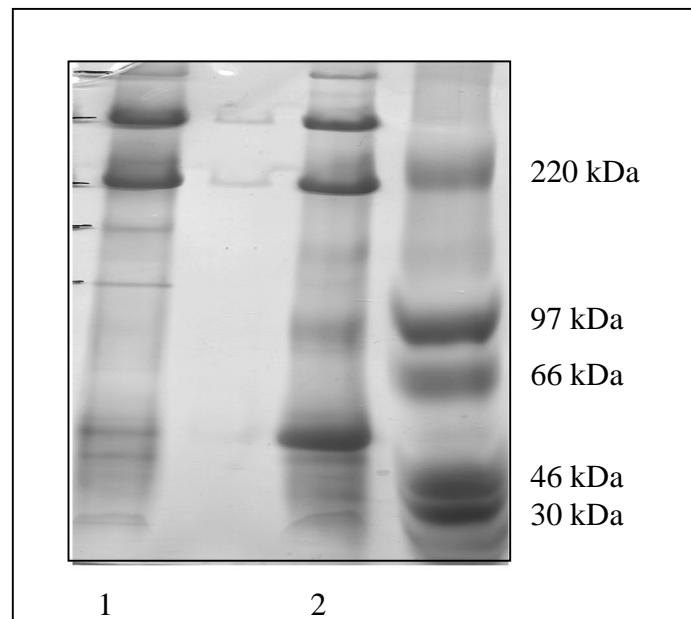


Abb. 3.15.2: Native gelelektrophoretische Auftrennung des *Helicobacter pylori*-Sonikats nach verschiedenen Aufreinigungsstufen. Die Proben wurden nach Wessel und Flügge gefällt und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen; das Gel wurde im Anschluß mit Coomassie G250 gefärbt. Die einzelnen Aufreinigungsstufen wurden mit 1 – 2 gekennzeichnet.

1: Uz / Salz- / Hitzefällung

2: Uz / Salz- / Hitzefällung / HIC

Auch in der Auftrennung durch die native Gelelektrophorese ist die Anreicherung einer Proteinbande bei 60 kDa nach der 4. Aufreinigungsstufe deutlich zu erkennen (Abb. 3.15.2).

Die einzelnen Proteinbanden wurden aus dem nativen Gel ausgeschnitten und durch Elektroelution aus dem Gel wieder in Lösung gebracht. Die eluierten Proteine wurden dann anhand von AGS-Zellen auf ihre apoptoseauslösende Aktivität untersucht. Es war jedoch keine der eluierten Proteinfractionen in der Lage, in den Magenepithelzellen Apoptose zu induzieren. Auch durch die Kombination aller Fraktionen aus der Elektroelution konnte keine Erhöhung der DNA-Fragmentierung erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.16 Proteinsequenzierung

Die Sequenzanalyse der im Apoptoseprozeß relevanten Proteinbanden ergab für die 60 kDa-Bande folgende Aminosäurenabfolge:

AKEIKFSDSARNLLFFEGVRQLHDA.

Diese Aminosäuresequenz entspricht dem Hitzeschockprotein HSP60 aus *Helicobacter pylori* (Synonyme: 60 kDa Chaperonin, Protein Cpn60, groEL Protein). Die exakte molekulare Masse beträgt 58,24 kDa.

Die Sequenzanalyse weiterer untersuchter Banden ergab für die

86 kDa-Bande: N-Methylhydantoinase

80 kDa-Bande: putative Hydantoin Utilisation

66 kDa-Bande: Urease- β -Untereinheit

44 kDa-Bande: aliphatische Amidase

40 kDa-Bande: γ -Glutamyltranspeptidase

30 kDa-Bande: Urease- α -Untereinheit

25 kDa-Bande: 26 kDa-Antigen

3.17 Wirkung von HSP60-Antikörper auf die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose in AGS-Zellen

Um zu überprüfen, ob das Hitzeschockprotein HSP60 tatsächlich an der Apoptoseauslösung beteiligt ist, wurde das *Helicobacter pylori*-Sonikat vor der Inkubation mit AGS-Zellen mit einem Antikörper gegen HSP60 versetzt. Das quantitative Ausmaß der Apoptose wurde mittels Histon Elisa bestimmt.

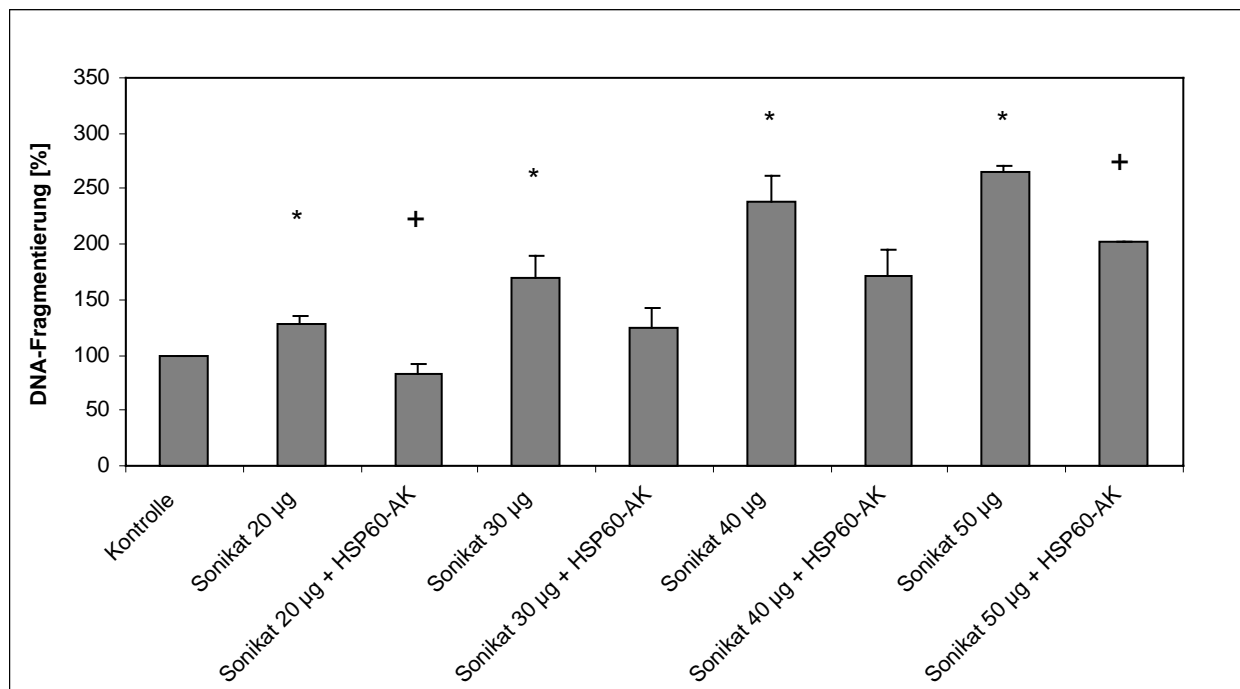


Abb. 3.17: Einfluß von HSP60-Antikörper auf die *H. p.*-induzierte Apoptoserate in AGS-Zellen. Das Sonikat wurde 30 min mit 10 µg/ml des Antikörpers vorinkubiert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden mit den angegebenen Sonikatkonzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Abb. 3.17 zeigt, daß die *H. p.*-induzierte DNA-Fragmentierung durch die Koinkubation mit 10 µg/ml eines gegen HSP60 gerichteten Antikörpers im Vergleich zum Sonikat gleicher Konzentration bis zu 60 % gehemmt wurde. Durch den Einsatz höherer Konzentrationen des Antikörpers konnte keine weitere Hemmung erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine alleinige Inkubation der Magenzellen mit dem HSP60-Antikörper hatte keinen Einfluß auf die Apoptoserate der AGS-Zellen.

Die Inkubation mit 1 – 5 µg rekombinantem, humanem HSP60 aus *E. coli* bewirkte keine Apoptoseinduktion in den Magenepithelzellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.18 Einfluß eines Hitzeschocks auf das Expressionsmuster von HSP60 in *Helicobacter pylori*

Da nach Yokota et al. (1994) die Inkubation des Bakteriums bei hohen Temperaturen die Expression von *Helicobacter pylori*-HSP60 erhöhen soll, wurde der Keim *Hp* 87 bei 43 °C einem Hitzeschock unterzogen.

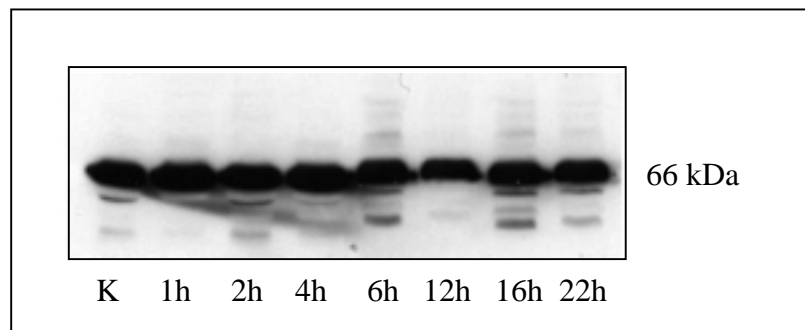


Abb. 3.18: Einfluß eines Hitzeschocks auf das Expressionsmuster von HSP60 in *Helicobacter pylori*. Der Keim wurde 48 h auf Blutagarplatten angezüchtet und jeweils 1 bis 22 h vor dem Ernten einem Hitzeschock von 1 h bei 43 °C unterzogen. Die gelelektrophoretische Auftrennung, das Western-Blotting, die Antikörperinkubation und die Detektion erfolgte nach 2.2.12.1, 2.2.15, 2.2.17 und 2.2.18.

In Abb. 3.18 ist zu erkennen, daß ein Hitzeschock von 1 h bei 43 °C das Expressionsmuster von HSP60 nicht veränderte.

3.19 ATPase-Klassifizierung im *Helicobacter pylori*-Sonikat

Da das HSP60-Molekül nach Röntgenstrukturanalysen eine ATPase-Domäne enthält, wurde eine Charakterisierung der bakteriellen ATPase bezüglich der Spezifität einwertiger Ionen durchgeführt.

	Phosphatgehalt [$\mu\text{M Pi/mg Protein} \cdot \text{h}$]
Kontrolle	$0,37 \pm 0,08$
10 mM NaCl	$0,82 \pm 0,09$
10 mM KCl	$2,13 \pm 0,13$
10 mM NH_4Cl	$0,83 \pm 0,10$
10 mM NaCl + 10 mM KCl	$0,9 \pm 0,07$
10 mM KCl + 100 μM Ouabain	$1,18 \pm 0,09$
10 mM KCl + 10 μM Schering 28080	$1,01 \pm 0,10$

Tab. 3.19: ATPase-Charakterisierung aus *H. p.* 87-Sonikat. 100 μg des aufgereinigten Sonikats wurden nach Vorschrift 2.2.19 mit den angegebenen Salzen und ATPase-Hemmstoffen inkubiert und bei einer OD von 625 nm gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM mit * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle aus drei unabhängigen Versuchen.

Die ATPase-Aktivität des aufgereinigten *Helicobacter pylori*-Sonikats war durch einwertige Salze, insbesondere K^+ stimulierbar (Tab. 3.19). Na^+ und NH_4^+ konnten die ATPase-Aktivität verdoppeln, K^+ mehr als verfünffachen. Die Koinkubation des *H. pylori*-Sonikats mit K^+ und Na^+ erhöhte die ATPase-Aktivität lediglich um das 2,5fache. Durch die Koinkubation des Sonikats mit K^+ und den Na^+/K^+ -und H^+/K^+ -ATPase-Hemmstoffen Ouabain (1 β ,3 β ,5 β ,11 α ,14,19-Hexahydroxycard-20[22]-enolide-3-[6-deoxy α -L-manno-pyranoside]) und Schering 28080 (2-Methyl-8-(phenylmethoxy)imidazo(1,2-a)pyridin-3-acetonitril) konnte die K^+ -induzierbare ATPase-Aktivität um ca. 50 % inhibiert werden.

3.20 Wirkung von ATPase-Hemmstoffen auf die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose in AGS-Zellen

Da die bakterielle ATPase-Aktivität durch die Inkubation mit ATPase-Hemmstoffen Ouabain und Schering 28080 inhibiert werden konnte, sollte die Wirkung der ATPase-Hemmstoffe auf die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose untersucht werden. Um festzustellen, ob die ATPase-Untereinheit des Hitzeschockproteins HSP60 an der Apoptoseauslösung beteiligt ist, wurde das aufgereinigte *Helicobacter pylori*-Sonikat mit den ATPase-Inhibitoren und AGS-Zellen inkubiert. Das quantitative Ausmaß der Apoptose wurde mittels Histon Elisa bestimmt.

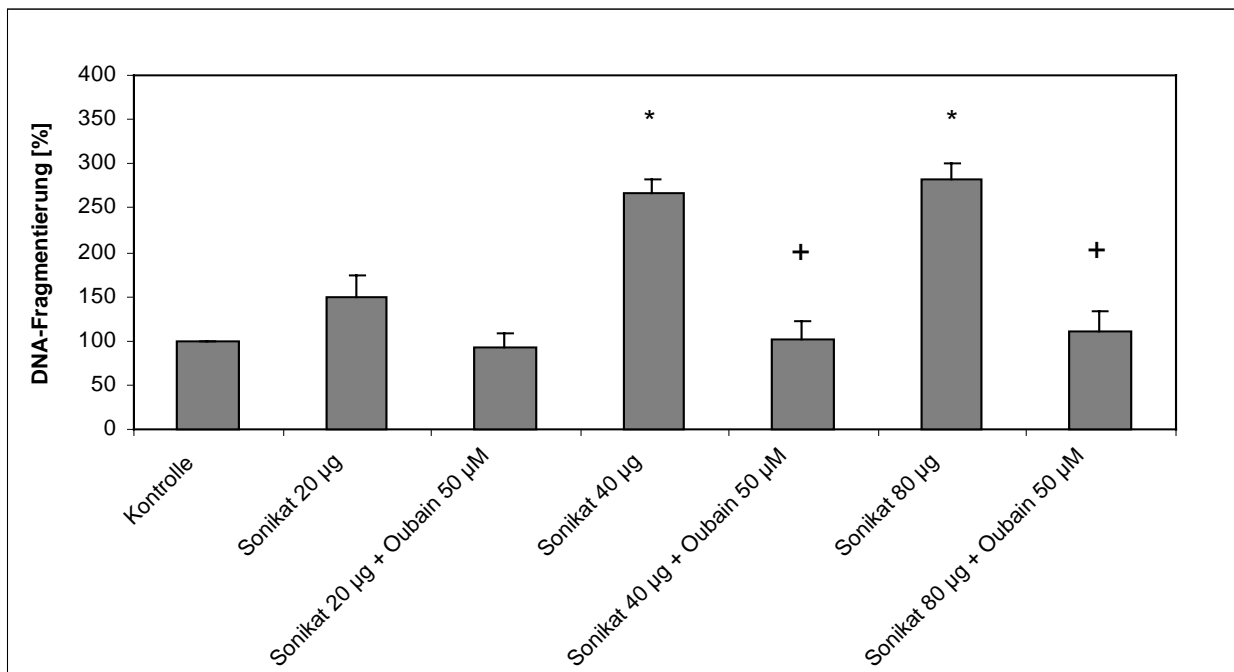


Abb. 3.20.1: Einfluß von Ouabain auf die *H. p.*-induzierte Apoptoserate in AGS-Zellen. Das Sonikat wurde 30 min mit dem ATPase-Hemmstoff vorinkubiert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

50 μ M des Na^+/K^+ -ATPase-Hemmstoffs Ouabain reduzierten die durch *H. pylori* ausgelöste DNA-Fragmentierung in den Magenepithelzellen vollständig (Abb. 3.20.1). Die Wirkung des ATPase-Hemmstoffs war konzentrationsabhängig. Die Inkubation der Zellen mit 10 μ M

Ouabain resultierte in einer verminderten Hemmung der keiminduzierten Apoptoserate (Ergebnisse nicht gezeigt). Ouabain allein zeigte keine Wirkung in den AGS-Zellen.

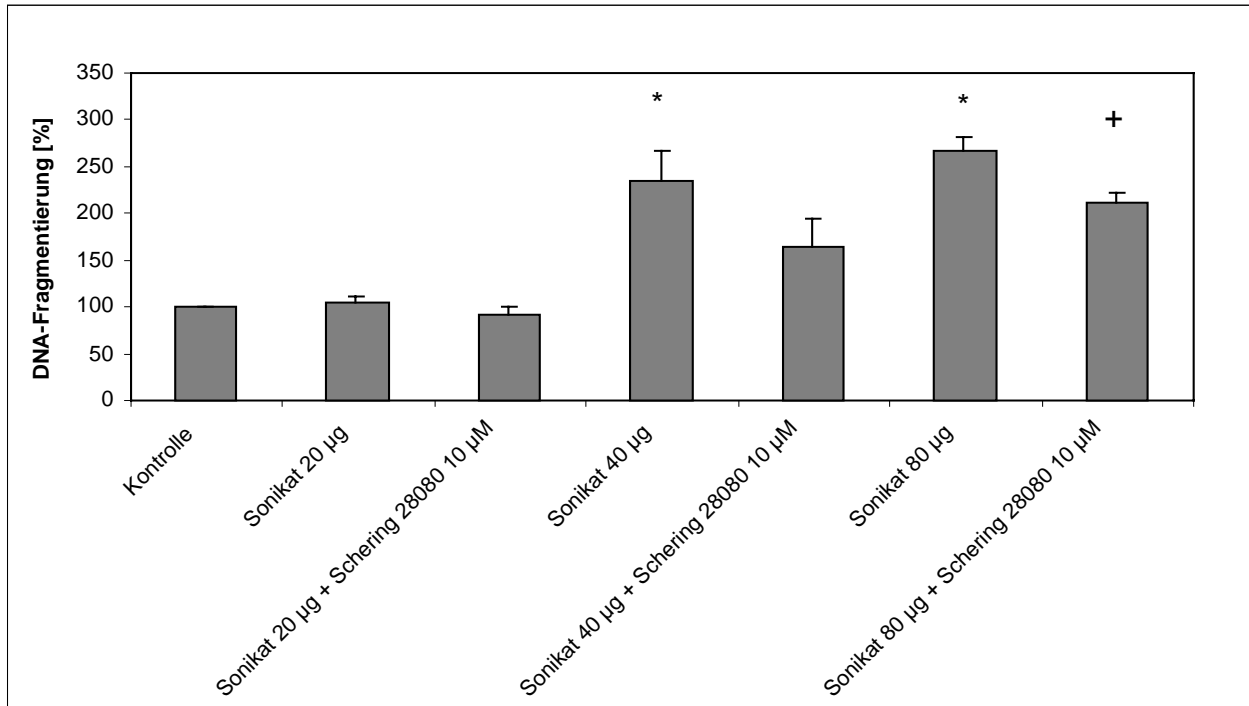


Abb. 3.20.2: Einfluß von Schering 28080 auf die *H. p.*-induzierte Apoptoserate in AGS-Zellen. Das Sonikat wurde 30 min mit dem ATPase-Hemmstoff vorinkubiert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Der H^+/K^+ -ATPase-Hemmstoff Schering 28080 inhibierte ab einer Konzentration von 10 μ M die keiminduzierte Apoptose um 70 % im Vergleich zum *H. p.*-Sonikat (40 μ g) bzw. 55 % (80 μ g) (s. Abb. 3.20.2). Eine alleinige Inkubation der Magenzellen mit Schering 28080 hatte keinen Einfluß auf Apoptoserate.

3.21 Wirkung von Dextransulfat auf die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose in AGS-Zellen

Um die Wirkung von Substanzen mit negativer Ladung auf den durch das Bakterium ausgelösten programmierten Zelltod zu untersuchen, wurden AGS-Zellen mit *Helicobacter pylori*-Sonikat und Dextransulfat inkubiert. Das quantitative Ausmaß der Apoptose wurde mittels Histon Elisa bestimmt.

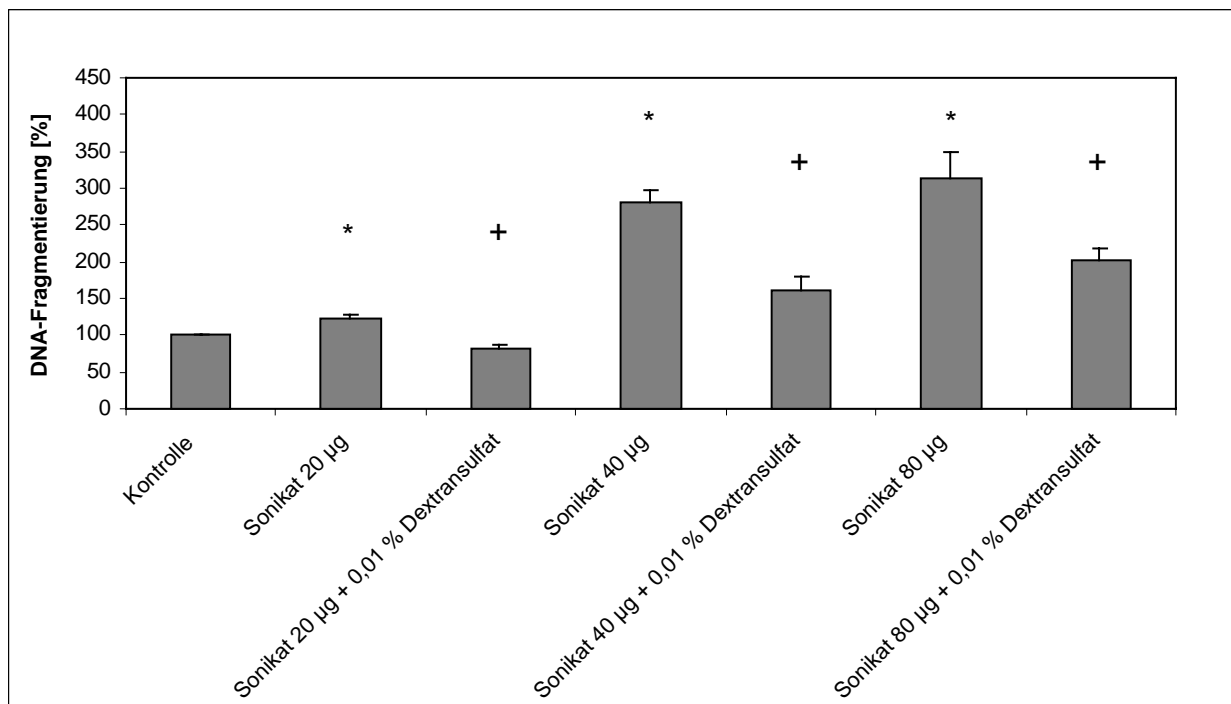


Abb. 3.21: Einfluß von Dextransulfat auf die *H. p.*-induzierte Apoptoserate in AGS-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit 0,01 % Dextransulfat vorinkubiert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden mit den angegebenen Sonikatkonzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

In Abb. 3.21 wird deutlich, daß die Vorinkubation der AGS-Zellen mit 0,01 % Dextransulfat die DNA-Fragmentierung signifikant hemmte und zwar um 41 % im Vergleich zu 20 µg Sonikat, bzw. um 121 % und 112 % im Vergleich zu 40 µg und 80 µg Sonikat. Die Wirkung war konzentrationsabhängig, da die Inkubation der Zellen mit 0,001 % Dextransulfat in einer verminderten Hemmung der keiminduzierten Apoptoserate resultierte (Ergebnisse nicht gezeigt). Dextransulfat allein zeigte keine Wirkung in den AGS-Zellen.

Ähnliche Ausmaße in der Hemmung der *H. p.*-ausgelösten DNA-Fragmentierung wurden durch den Einsatz von 0,01 % Tween erreicht (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.22 Wirkung von Ca^{2+} -Kanalblockern auf die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose in AGS-Zellen

Die Wirkung von Ca^{2+} -Kanalblockern auf die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose wurde durch den Einsatz von Nifedipin (1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-3-5-pyridindicarbonsäure-dimethylester), LaCl_3 und TMB8 getestet. Das *H. p.*-Sonikat wurde mit den Ca^{2+} -Antagonisten und AGS-Zellen inkubiert. Das quantitative Ausmaß der Apoptose wurde mittels Histon Elisa bestimmt.

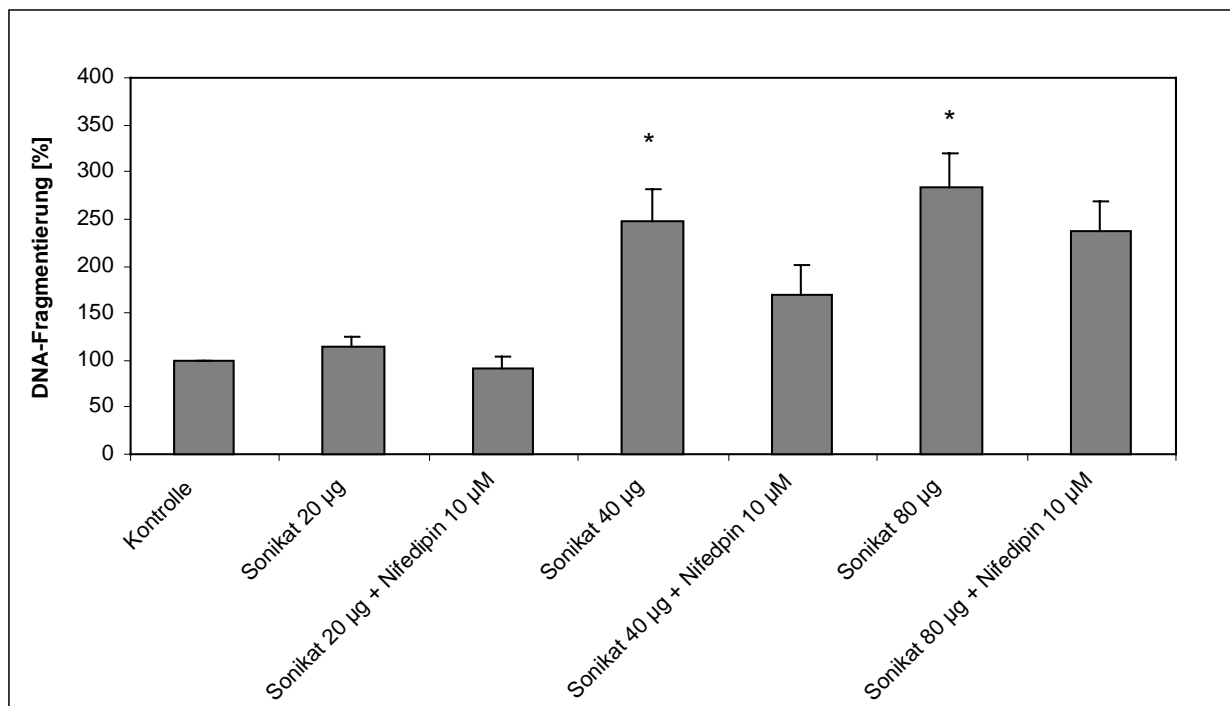


Abb. 3.22: Einfluß von Nifedipin auf die *H. p.*-induzierte Apoptoserate in AGS-Zellen. Die Zellen wurden 30 min mit dem Ca^{2+} -Kanalblocker vorinkubiert. Die Zellen wurden dann 24 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate mittels Elisa^{plus}-Kit von Roche. Die Kontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, * = $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle und + = $p < 0,05$ gegenüber dem Sonikat.

Abb. 3.22 zeigt, daß die Koinkubation der Magenepithelzellen mit 10 μM Nifedipin die keiminduzierte Apoptoserate um 79 %, bzw. 45 % im Vergleich zu 40 μg , bzw. 80 μg Sonikat hemmen konnte. Dagegen konnte durch den Einsatz von 10-100 μM TMB8 und 10-100 μM LaCl_3 keine Veränderung in der DNA-Fragmentierung erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine alleinige Inkubation der Magen­zellen mit den Ca^{2+} -Antagonisten hatte keinen Einfluß auf die Apoptoserate.

4 Diskussion

4.1 *Helicobacter pylori* und Apoptose

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien belegen, daß die Infektion von Magenepithelzellen mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* mit einem erhöhten programmierten Zelltod einhergeht (Baik et al., 1996; Moss et al., 1996).

Eine Inkubation von AGS-Zellen mit *H. pylori*-Sonikat (zur Auslösung der Apoptose muß der Keim nicht vital sein) induzierte konzentrationsabhängig den programmierten Zelltod. Um zytotoxische Effekte, die bei der Inkubation mit dem vitalen Keim auftreten, zu minimieren, wurden die Zellen mit *Helicobacter pylori*-Sonikaten mit einem Proteingehalt von 40 µg/ml inkubiert. In der hier vorliegenden Untersuchung induzierte das *H. p.*-Sonikat, das die cytosolischen Komponenten des Keims enthielt, eine gegenüber der Kontrolle 2- bis 3fach erhöhte Apoptoserate. Ähnliche Ausmaße in der DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit *Helicobacter pylori* wurden auch durch Kim et al. (2000) in den Zelllinien Kato-III SNU-5 und Hs746T dokumentiert.

Es ist bislang noch nicht vollständig geklärt, über welche Mechanismen und Signaltransduktionswege das Bakterium *H. pylori* in den Magenzellen den direkten Zelltod hervorruft.

Nach Untersuchungen von Chen et al. (1997) geht die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose *in vitro* und *in vivo* mit einer erhöhten Expression des proapoptotischen Proteins Bak einher, während die Expression anderer Proteine der Bcl-2-Familie unbeeinflusst bleiben.

Verschiedene Untersuchungen deuten auf eine Involvierung des Fas-Rezeptors in der *H. pylori*-induzierten Apoptose hin. Fas (Apo-1/CD95) ist ein cysteinreiches Rezeptor-Glycoprotein für apoptotische Signale auf der Oberfläche von vielen Zelltypen und gehört zu der Familie der TNF-Rezeptoren (Nagata et al., 1997), die eine wichtige Rolle im durch *H. pylori* ausgelösten programmierten Zelltod in Magenepithelzellen spielen. Studien von Wang et al. (2000) ergaben sowohl nach Inkubation von Magenepithelzellen als auch von polymorphen Nucleophilen mit *Helicobacter pylori* eine gesteigerte Fas-Expression (Hayashi et al., 1997; Houghton et al., 1999). Auch Jones et al. (1999) entdeckten, daß die Infektion mit

Helicobacter pylori in vitro zu einer gesteigerten Apoptoserate führte, die von einer erhöhten Fas-Rezeptor-Expression in AGS-Zellen begleitet wurde. Allerdings mußte der Keim noch auf anderen Signalwegen Apoptose induzieren, da die Koinkubation mit einem neutralisierenden anti-Fas-Antikörper den keiminduzierten programmierten Zelltod nicht vollständig hemmen konnte.

4.2 Rolle von VacA und CagA in der Apoptoseinduktion

Als wichtiger Virulenzfaktor zur Auslösung der Apoptose wird unter anderem das vakuolisierende Zytotoxin VacA des Bakteriums diskutiert. Das 87-kDa-Protein ruft Störungen intrazellulärer Membranumbauvorgänge hervor und ist für die Entstehung von Schleimhautläsionen verantwortlich (Papini et al., 1994). Das VacA-Toxin, dessen Gen in allen *H.p.*-Stämmen nachweisbar ist, wird durch einen aktiven Mechanismus aus der Bakterienzelle in das umgebende Milieu sezerniert und bindet an eine Vielzahl eukaryotischer Zelloberflächenrezeptoren (Papini et al., 2001). Zelluläre Effekte, die durch VacA hervorgerufen werden, sind Zellvakuolisierung, Veränderungen endolysosomaler Funktionen, Porenformation in der Plasmamembran und Apoptose. Weitere Angriffspunkte in der Zelle sind endocytotische Vesikel, die Mitochondrien, das Zytoskelett und Zell-Zell-Verbindungen. Es wird daher diskutiert, ob VacA als A/B-Toxin oder als kanalbildendes Toxin eingestuft werden soll.

In ihrer Studie zeigten Galmiche et al. (2000), daß sowohl VacA als auch dessen N-terminales Fragment, nicht aber dessen C-terminales Fragment in die Mitochondrien translozierten und in diesen eine Cytochrom *c*-Freisetzung induzierten, die einen wichtigen Schritt in der Apoptoseauslösung darstellt. Dieser Prozeß konnte durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 unterbunden werden, die Verwendung einer FADD-negativen Zelllinie jedoch war nicht in der Lage, die Apoptoseinduktion zu hemmen, was auf die Involvierung der Mitochondrien in der *H.p.*-induzierten Apoptose hinweist.

Kuck et al. (2001) stellten rekombinantes VacA her, welches in der Lage war, in der Zelllinie AGS Apoptose auszulösen. Ein *H. p.*-Lysat, dessen VacA durch Immunpräzipitation entfernt wurde, zeigte eine reduzierte apoptotische Aktivität. Allerdings vermuteten Kuck et al. noch andere Faktoren wie LPS, Urease, Proteasen und CagA, die in der keiminduzierten Apoptose eine Rolle spielen.

Nach Negrate et al. (2001) ist die in intestinalen Epithelzellen durch *H. pylori* induzierte Apoptose auf die Expression der keimeigenen Pathogenitätsinsel (PAI) zurückzuführen. Diese besteht aus einem ca. 40 kbp großen DNA-Abschnitt, der verschiedene Gene enthält, wie z. B. die für das vakuolisierende Zytotoxin VacA und das 128 kDa zytotoxinassoziierte Antigen CagA, jedoch ist *cagA*, das Gen, das für dieses Protein kodiert, nicht in allen Stämmen vorhanden. Die Studien von Negrate et al. zeigten, daß *Vac*⁺/*PAI*⁺-*Helicobacter pylori* nicht aber *Vac*⁻/*PAI*⁻-Keime über den Fas-abhängigen Signalweg Caspase 8 und 3 aktivierten und zwar über die Aktivierung von SAPK, da SB202190, ein Inhibitor der SAPK, die Caspase 3-Aktivierung signifikant hemmte.

Die Rolle des vakuolisierenden Zytotoxins VacA und seines assoziierten Proteins CagA wird in der Induktion des programmierten Zelltods kontrovers diskutiert. Die Involvierung des VacA- bzw. CagA-Status in der Apoptoseauslösung wurde in dieser Arbeit durch Verwendung von Negativmutanten, die wie der Wildtyp in der Lage waren, Apoptose zu induzieren, ausgeschlossen.

Die Aufreinigung über Gelfiltrationschromatographie ergab weiterhin, daß die Größe des Apoptose induzierenden Faktors zwischen 55 und 76 kDa lag. Nach diesen Ergebnissen sind VacA und CagA schon durch ihre molekularen Größen von 87 kDa bzw. 128 kDa als Apoptose induzierende Faktoren auszuschließen. Weiterhin wurde durch die Sequenzanalyse die Beteiligung von VacA und CagA am programmierten Zelltod ausgeschlossen, da diese in apoptotisch aktiven Fraktionen nicht ermittelt werden konnten.

Andere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So wiesen Kim et al. (2000) in Hs746T-, AGS-, KATO-III- und SNU-5-Zellen nach, daß sowohl der Vac-, als auch der Cag-Status keinerlei Unterschiede in der Apoptoseinduktion zeigte. In sämtlichen Zelllinien wurde nach Inkubation mit *cagA*⁺/*Vac*⁺, *cagA*⁺/*Vac*⁻ und *cagA*⁻/*Vac*⁻-Stämmen eine ähnliche Apoptoserate gemessen. Somit schlossen Kim et al. den Vac- und Cag-Status als Apoptose auslösende Faktoren aus. Auch Kurosawa et al. (2002), Chen et al. (1997) und Peek et al. (1999) demonstrierten, daß durch *H. p.* induzierte Apoptose vom CagA/VacA-Status unabhängig war, da auch Cag⁻- und Vac⁻-Stämme in Magenepithelzellen den Zelltod induzieren konnten.

4.3 Lipopolysaccharide

Helicobacter pylori-LPS sind als Virulenzfaktor mit geringer Toxizität anerkannt und werden als ein Auslöser bei *H.p.*-Erkrankungen diskutiert.

LPS sind ein Hauptbestandteil der Membran gramnegativer Bakterien und bestehen aus den drei Bausteinen Lipid A, die als bioaktive Komponente identifiziert wurde, dem Kernoligosaccharid und dem O-Seitenkettenpolysaccharid. Alle drei Bauelemente weisen bei *H. pylori* gegenüber den Lipopolysacchariden anderer Bakterien Besonderheiten auf, die im Bezug auf die Pathogenese von Interesse sind. So konnte von Geis et al. (1990) gezeigt werden, daß das Lipid A ungewöhnliche Fettsäuren enthält, was dazu führt, daß das Lipid A nur geringe Toxizität und geringe immunmodulatorische Aktivität aufweist. Ein weiterer Befund ist, daß die O-Seitenkettenpolysaccharide von *H. pylori*-LPS Zuckerstrukturen enthält, die exakt einem Oberflächenantigen menschlicher Zellen (Lewis^x-Antigen) entsprechen.

Nach Kawahara et al (2001) führten *H. p.*-LPS zu einer Erhöhung der Caspase-8-Aktivität. Die aktivierte Caspase-8 stimulierte die Cytochrom *c*-Freisetzung aus den Mitochondrien und führte über die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 zur Apoptose.

LPS, die aus cag PAI-positiven Keimen (Typ I) isoliert wurden, induzierten in Primärkultur-Magenzellen aus Meerschweinchen den programmierten Zelltod, während Keime, denen die Gene der Pathogenitätsinsel fehlten, nicht dazu in der Lage waren (Kawahara et al., 2001). Die Primärkulturzellen exprimieren den Toll-like Rezeptor 4, der in *vivo* und in *vitro* einen Rezeptor für *Helicobacter pylori*-LPS darstellt und intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die in der Apoptoseinduktion eine Rolle spielen.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wurde die Involvierung von bakteriellen Lipopolysacchariden als ein Faktor in der Induktion des Zelltodes ausgeschlossen, da die Inkubation von AGS-Magenepithelzellen mit 10–200 µg/ml der aus dem Keim extrahierten LPS keinerlei Apoptosesteigerung bewirkten.

Diese Ergebnisse werden von Munzenmaier et al. (1997) bestätigt, die dokumentierten, daß aus *H. pylori* isolierte LPS keinen apoptotischen Effekt auf Magenepithelzellen hatten. Auch Cario et al. (2000) wiesen nach, daß intestinale Epithelzellen relativ insensitive gegenüber LPS

waren. Konzentrationen von mehr als 5µg/ml waren nötig, um TLR4-abhängige Signalwege zu aktivieren.

4.4 Urease

Die *Helicobacter pylori*-Urease, ein Enzym, das die Spaltung von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlendioxid katalysiert, wird als ein pathogener Faktor diskutiert, der zur Apoptose und somit zur Ulkulentstehung beitragen kann. Die Urease wird in die Umgebung des Bakteriums abgegeben, der Mechanismus der Ausschleusung ist jedoch noch unklar (Mobley et al., 1995). Das native, cytosolische Enzym mit einer Molmasse von 550 kDa besteht aus sechs großen Untereinheiten (UreB, 61-66 kDa) und sechs kleinen Untereinheiten (UreA, 30 kDa) (Smoot 1997). Für die volle Enzymaktivität der Urease sind zwei Nikelatome und der Nickel-Transporter NixA erforderlich (Bauerfeind et al., 1996). Auch das Hitzeschockprotein HspA mit einer Größe von 62 kDa, das mit Urease assoziiert ist und wie diese Nickel bindet, wird für die volle Enzymaktivität benötigt (Kansau et al., 1996). Weitere 5 accessorische Proteine UreI, UreE, UreF, UreG, und UreH sind für die Nikelinserion ins Enzym notwendig.

Urease-Aktivitätsmessungen zeigten in dieser Arbeit, daß das Enzym auch nach mehreren Aufreinigungsschritten noch vorhanden war, dessen Aktivität jedoch nach dem ersten Aufreinigungsschritt abnahm. K_m betrug nach der Ultrazentrifugation 0,96 und entsprach der von Mobley et al. (1988) ermittelten Michaelis-Menten-Konstante von $0,8 \pm 0,1$. Die leichten Unterschiede der Werte sind auf die Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme und Temperaturen zurückzuführen. Auch Dunn et al. (1990) bestimmten den K_m -Wert für Urease nach Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie. Mit 0,3 lag K_m in derselben Größenordnung wie nach dem zweiten Aufreinigungsschritt dieser Arbeit (0,27). Dunn et al. bestätigten weiterhin, daß die Urease-Aktivität nach einzelnen Aufreinigungsschritten abnimmt. Der niedrige Wert für K_m weist auf eine hohe Substrataffinität hin und zeigt eine maximale Effizienz des Enzyms bei millimolaren Harnstoffkonzentrationen, die im Magen vorherrschen, an.

Nach diesen Ergebnissen kann eine Beteiligung der Urease an der Apoptoseauslösung nicht ausgeschlossen werden, da auch in der Proteinsequenzanalyse das Vorhandensein der Ureaseuntereinheiten UreA und UreB in den apoptotisch aktiven Fraktionen nachgewiesen wurde.

Auch Kohda et al. (1999) und Smoot (1997) wiesen eine Beziehung zwischen der Urease-Aktivität von *Helicobacter pylori* und der durch den Keim induzierten Apoptose nach. Die direkte zellschädigende Wirkung war auf den aus der keimeigenen Urease entstehenden Ammoniak zurückzuführen.

Nach Studien von Igarashi et al. (2001) waren jedoch weder Urease noch Ammoniak in der Lage, eine signifikante Erhöhung der Apoptose in MKN 45-Magenepithelzellen auszulösen. Die Koinkubation der Zellen mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ , die einzeln keine Apoptose induzieren konnten, dem Keim und Harnstoff erhöhte die Apoptoserate jedoch um ein Vielfaches. Igarashi et al. schlossen, daß die Entstehung von Ammoniak durch Urease nur in Verbindung mit Zytokinen, die während der Infektion mit *Helicobacter pylori* von der Magenmukosa gebildet werden, (Crabtree et al., 1991) eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine 137 %ige bzw. 74 %ige Erhöhung der *H. pylori*-induzierten DNA-Fragmentierung (im Vergleich zu 40 μ g bzw. 60 μ g Sonikat) in Magenepithelzellen durch Zugabe von 10 mM Harnstoff erreicht. Ammoniak allein bewirkte bei einer Konzentration von 60 μ M eine 60 %ige Steigerung der Apoptoserate in AGS-Zellen, zeigte jedoch ab einer Konzentration von 300 μ M eine nekrotische Wirkung.

Nach Tsujii et al. (1992) induziert Ammoniak *in vivo* ab einer Konzentration von 187,5 mM (0,6 %) Schädigungen in Magenschleimhautzellen. Der basische pH-Wert einer Lösung spielte keine Rolle, da z. B. eine NaOH-Lösung gleichen pH-Wertes keine Schädigungen in den Magen Zellen hervorrief. Somit war ausschließlich Ammoniak selbst für die schädigende Wirkung verantwortlich. Das durch die Ureaseaktivität entstehende NH₃ passiert wahrscheinlich die Mitochondrienmembran, erhöht den intramitochondrialen pH-Wert und hemmt somit die mitochondriale Atmung in Magenepithelzellen. Dieser Effekt allein reichte zwar nicht aus, um Apoptose zu induzieren, aber er war in der Lage, den rezeptorvermittelten Zelltod zu erhöhen.

Daher ist davon auszugehen, daß der durch die Ureaseaktivität entstandene Ammoniak durchaus eine zellschädigende Wirkung auf Magenepithelzellen besitzt und das Ausmaß der keiminduzierten Apoptose erhöhen kann, allerdings nicht der alleinige Faktor ist, der in der Apoptoseinduktion eine Rolle spielt, da die Harnstoff-Konzentration im Magen mit 2-3,5 mM unter der in der Untersuchung eingesetzten Konzentration von 10 mM liegt, aber erst durch Zugabe dieser Konzentrationen im Zellsystem eine Erhöhung der Apoptoserate erzielt wurde.

Die Apoptose auslösende Wirkung auf Magenepithelzellen, die mit der Anheftung des Keims einhergeht, muß auf der Interaktion zwischen *H. pylori* und Zelloberflächenrezeptoren, die extrazelluläre Signale in die Zelle weiterleiten können, beruhen.

Klasse II MHC-Moleküle sind dafür bekannt, Antigene zu binden und CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren. Nach Scholl et al. (1994) und Newell et al. (1993) löst die Kreuzreaktion von MHC-Molekülen mit bakteriellen Superantigenen Apoptose aus. Fan et al. (1998) demonstrierten, daß die Induktion der Apoptose in Magenepithelzellen über die Bindung von *H. pylori* an MHC II-Moleküle verläuft, da der keiminduzierte Zelltod durch den Einsatz eines gegen MHC II-Moleküle gerichteten Antikörpers inhibiert werden konnte. Das Ausmaß der Apoptose konnte noch gesteigert werden, wenn die Zellen zusätzlich mit INF- γ inkubiert wurden, da INF- γ die Expression von MHC-Molekülen erhöhte. Dieser Effekt konnte in den Magenzelllinien Kato III und N87 nachgewiesen werden, da diese Zelllinien laut Fan et al. MHC-Moleküle exprimieren. In AGS-Zellen, die keine MHC-Moleküle exprimieren, konnte keine Apoptose ausgelöst werden.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, die belegen, daß in AGS-Zellen durchaus Apoptose durch *H. pylori* induziert werden kann. Fan et al. schlossen allerdings nicht aus, daß es noch andere Rezeptoren und Signaltransduktionswege geben kann, auf denen in Zellen ohne MHC-Moleküle der programmierte Zelltod induziert wird.

In Folgestudien identifizierten Fan et al. (2000) *H. pylori*-Urease als ein Superantigen, das MHC II-Moleküle in Magenepithelzellen als Rezeptoren benutzt und Apoptose auslöst. Die Bindung der Urease an die MHC-Moleküle wird wahrscheinlich durch weitere, noch nicht genauer identifizierte Proteine unterstützt.

Knipp et al. (1996) isolierten ein cytosolisches, proliferationshemmendes Protein aus dem Bakterium mit einer Molmasse von etwa 100 kDa, das durch eine 30-minütige Inkubation bei 70 °C inaktiviert wurde, bei 56 °C jedoch noch seine volle Aktivität besaß. Das Protein war auch sensitiv gegenüber der Verdauung mit Trypsin. Weiterhin war die Aktivität des Proteins durch die Fällung mit mehr als 50 % Ammoniumsulfat nicht mehr nachweisbar. Das proliferationshemmende Protein war über einen weiten pH-Bereich stabil. Bei einem pH-Wert von 2 und 12 war die Aktivität zwar vermindert, aber immer noch detektierbar.

Die Methoden dieser Publikation wurden in dieser Arbeit zur Aufreinigung des Apoptosefaktor ausgenutzt. Nach dem Zellaufschluß und der Ultrazentrifugation wurde die apoptotische Aktivität des Keims im Überstand detektiert. Der Apoptose auslösende Faktor

mußte daher ein cytosolisches Protein sein. Der Faktor war bis zu einer Temperatur von 60 °C und einer Ammoniumsulfatkonzentration von 50 % stabil. Andere, sensitivere Proteine wurden durch diese Verfahren ausgefällt und abgetrennt. Somit können Lipopolysaccharide in der Induktion des Zelltods ausgeschlossen werden, da diese hitzestabil sind.

Durch die weitere Aufreinigung des Faktors über Hydroxylapatit und hydrophobe Interaktionschromatographie konnte dieser 400fach angereichert werden.

Das Apoptose auslösende Protein hatte sein Aktivitätsmaximum bei pH 6-11. Unterhalb bzw. oberhalb dieses Bereiches nahm die Aktivität des Faktors stark ab.

Demnach kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem proliferationshemmenden Protein in der Studie von Knipp et al. und dem Apoptose auslösenden Protein in dieser Arbeit um dasselbe Protein handelt.

4.5 Hitzeschockproteine

Die hochkonservierte Familie der Streß- oder Hitzeschockproteine dienen der Faltung, dem Transport in verschiedene zelluläre Kompartimente und der Assoziation von Proteinen zu größeren Strukturen. Auch die Degradation von instabilen Proteinen sowie die Verhinderung der Proteinaggregation und die Entfaltung falsch gefalteter Proteine gehört zu den Aufgaben der Hitzeschockproteine. Die schützende Wirkung der HSPs ist auf die Fähigkeit, als molekulare Chaperone zu fungieren, zurückzuführen. Hitzeschockproteine können durch oxidativen Streß, Temperaturveränderungen, UV-Strahlung, Entzündungen und virale Infektionen aktiviert werden.

Die Einteilung der HSPs erfolgt in vier Gruppen ihrer molekularen Größe entsprechend in HSP90, HSP70, HSP60 und kleine HSPs (Garrido et al.;2001; Xanthoudakis et al.; 2000). Jede Gruppe besitzt verschiedene Mitglieder, die entweder konstitutiv (HSP60, HSC70 und HSP90) oder durch Streßinduktion exprimiert werden (HSP27 und HSP70). Hitzeschockproteine sind im Cytosol, in den Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum und im Zellkern lokalisiert.

Die Kristallstruktur des HSP70 wurde durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt (Kiang et al.; 1998). Das N-terminale 44 kDa-Fragment enthält eine ATPase-Domäne, das 18 kDa-Fragment die peptidbindende Domäne, die gefaltete und ungefaltete Proteine bindet. Der 10 kDa C-Terminus besitzt eine hochkonservierte Sequenz.

Kürzlich wurde demonstriert, daß Hitzeschockproteine auch regulierend in den programmierten Zelltod eingreifen. HSP27 und HSP70 wird eine antiapoptotisch, HSP60 und HSP10 eine proapoptotische Funktion zugeschrieben.

HSP60 ist ein homooligomeres Protein, das aus 14 Untereinheiten besteht, die zwei heptamere Ringe und damit die für Chaperone typische faßartige Struktur bilden. Das Protein ist hauptsächlich in der Mitochondrienmatrix lokalisiert, wurde jedoch auch außerhalb der Mitochondrien detektiert. HSP60 ist für die Faltung mitochondrialer Proteine zuständig und erleichtert die proteolytische Degradation falsch gefalteter oder denaturierter Proteine in einem energieabhängigen Prozeß. Die Substratbindungs- und ATPase-Aktivität des HSP60 wird durch HSP10 reguliert. In der Gegenwart von ADP binden zwei HSP10 an ein HSP60.

Eine proapoptotische Rolle für HSP60 und HSP10 wurde von zwei Arbeitsgruppen demonstriert. Xanthoudakis et al. (1999) zeigten in Jurkat-Zellen, daß HSP60 die Aktivierung der Caspase 3 durch Initiator-Caspasen (6, 8 und 9) fördert. Der stimulatorische Effekt von HSP60 war energieabhängig und nur in Gegenwart von ATP zu messen.

Studien von Samali et al. (1999) ergaben, daß Procaspase 3 in den Mitochondrien in einem Komplex mit HSP60 und HSP10 vorliegen. Durch die Induktion der Apoptose dissoziierte die Caspase 3 von diesem Komplex und wurde somit aktiviert. Rekombinantes HSP60 und HSP10 erhöhten die Aktivität der Procaspase 3 in vitro und wurden somit als positive Regulatoren in der Apoptoseinduktion angesehen. Die Aktivierung fand jedoch nur in Kombination mit Cytochrom *c*, dATP und ATP statt.

Es ist daher nicht auszuschließen, daß Hitzeschockproteine, die die Aggregation Faltung und den Transport von Proteinen beeinflussen, auch direkt in den apoptotischen Signalweg eingreifen, da HSP60 und HSP10 die Reifung der Proaspase 3 induzieren.

In dieser Arbeit zeigte sowohl die denaturierende als auch die native gelelektrophoretische Auftrennung der apoptotisch aktiven Fraktionen des *H. pylori*-Sonikats nach verschiedenen Aufreinigungsstufen eine deutliche Anreicherung einer Proteinbande bei 60 kDa, dessen Aminosäuresequenz in sequenzanalytischen Untersuchungen dem Hitzeschockprotein HSP60 aus *H. pylori* entsprach.

Dunn et al. (1992) isolierten in verschiedenen *H. pylori*-Stämmen ein 54 kDa-Protein, welches Homologien zur Chaperonin cpn60-Familie der Hitzeschockproteine aufweist und in einer großen Anzahl gramnegativer Bakterien vorhanden ist. Auch Macchia et al.

identifizierten ein 58 kDa-Antigen aus *Helicobacter pylori*, welches in allen getesteten Keimen vorhanden war, und ordneten es der HSP60-Familie zu.

Kawahara et al. (1999) wiesen in Seren von Patienten mit MALT-Lymphomen Auto-Antikörper gegen HSP60 nach. Ein LK-2-Antikörper gegen HSP60 detektierte sowohl in HGC-27-Zellen von Patienten mit MALT-Lymphomen als auch in *H. pylori* eine 60 kDa-Bande. HSP60-Epitope sind auch auf der Zelloberfläche von MKN45 und KatoIII-Zellen nachgewiesen worden. LK-2 erkennt ein Epitop (Aminosäuren 383 bis 419) der humanen HSP60-Proteine. Es wird daher vermutet, daß in humanen und bakteriellen HSP60-Proteinen ein gemeinsames Epitop vorhanden ist. Die Infektion mit dem Bakterium induziert die Produktion von Antikörpern gegen bakterielles HSP60, die jedoch - durch die molekulare Ähnlichkeit - auch mit HSP60 des Wirts kreuzreagieren.

Durch die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen HSP60 konnte das Vorhandensein von HSP60 im *Helicobacter pylori*-Sonikat nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Immundetektion in dieser Arbeit bestätigt werden. Allerdings konnte im Gegensatz zu Yokota et al. (1994), die durch den Einsatz von mono- und polyklonalen Antikörpern eine gesteigerte Expression von HSP60-Proteinen durch Temperaturerhöhung nachwiesen, ein Hitzeschock von 43 °C die Expression des HSP60 aus *Hp* 87 nicht erhöhen. Es handelt sich daher, wie auch von Garrido et al. (2001) dokumentiert, um ein konstitutiv exprimiertes Protein.

Es gibt Anzeichen, daß einige cpn60-Homologe eine - durch die Immunantwort des Wirtes ausgelöste - gewebeschädigende Wirkung ausüben und somit an der Entstehung von Schleimhautläsionen beteiligt ist (Born, et al., 1990; Young et al., 1990). Kürzlich wurde demonstriert, daß die Infektion mit *Helicobacter pylori* eine Immunantwort in Magenepithelzellen hervorrufen kann, die wahrscheinlich direkt gegen zelleigene HSP-Proteine gerichtet ist (Negrini et al., 1991). *H.p.*-HSP können so zu Gewebeschädigungen beitragen, indem sie T-Zellen zur Kreuzreaktion mit ähnlichen Bestandteilen endogener Hitzeschockproteine der infizierten Wirtszelle stimulieren.

Diese Hypothese würde erklären, warum die *H.p.*-Infektion in vivo immer mit einer entzündlichen Reaktion einhergeht, obwohl nicht alle Keime Zytotoxine produzieren (Cover et al., 1990; Leunk et al., 1988). Die Zytotoxine sind somit nicht für die Induktion der

Entzündungsreaktion verantwortlich, können aber die Schwere der Zellschädigung beeinflussen und somit zur Ulkulentstehung beitragen (Figura et al., 1989).

Yamaguchi et al. (1997) untersuchten die Beziehung zwischen der Expression von *Helicobacter pylori* HSP60-Hitzeschockproteinen und deren Adhäsion an Magenepithelzellen. Auf der Bakterienoberfläche lokalisiertes HSP60 vermittelt die Adhäsion an Magenepithelzellen MKN45, MKN28 und KatoIII über die spezifische Bindung an Sulfatide (Sulfoglycolipide) *in vitro* und ist somit ein potentieller Faktor für Initiation einer Infektion. In MKN45-Zellen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Adhärenz-Aktivität von *H. pylori* und der Expression von HSP60 nachgewiesen werden. Die Adhäsionsfähigkeit des Keims und somit der Grad der Entzündung war jedoch unabhängig von der Ureaseaktivität und der Produktion des vakuolisierenden Zytotoxins.

Diese Adhäsion wurde durch Koinkubation mit 8µg/ml eines monoklonalen Antikörpers (MabH20; Klasse IgM), der gegen HSP60 gerichtet ist, signifikant inhibiert. Da diese Inhibierung nicht vollständig war, mußten noch andere Faktoren in der Adhärenz des Bakteriums an die Zelle eine Rolle spielen.

Durch die Verwendung von 10 µg/ml des monoklonalen HSP60-Antikörpers konnte die keiminduzierte DNA-Fragmentierung in dieser Untersuchung bis zu 60 % inhibiert werden. Die Adhärenz von *Helicobacter pylori*-HSP60 an Magenepithelzellen und die erwiesene Beteiligung des HSP60 an der Apoptoseauslösung stehen demnach in einem engen Zusammenhang. Das HSP60-Molekül übt wahrscheinlich seine zellschädigende Wirkung über die Bindung an Rezeptoren der Wirtszelle aus, die für die Weiterleitung von apoptotischen Signalen zuständig sind.

Es wäre jedoch auch möglich, daß das HSP60 nach dessen Adhäsion an die Zelle internalisiert wird und dann in der Zelle direkt an der Apoptoseinduktion beteiligt ist, indem es die Reifung der Procaspase 3 fördert. Allerdings müßten bei diesem Prozeß noch andere extrazelluläre Apoptosestimuli und das mit HSP60 assoziierte HSP10 eine Rolle spielen.

Die Tatsache, daß die *H. p.*-ausgelöste Apoptose nicht vollständig gehemmt werden konnte, läßt sich durch die Verwendung eines Antikörpers, der gegen humanes und nicht gegen keimeigenes HSP60 gerichtet ist, erklären. Obwohl die Epitope des humanen und bakteriellen HSP60 sehr ähnlich sind, war die Spezifität des Antikörpers nicht gegeben. Yamaguchi et al. (1997) erklärten sich die unvollständige Hemmung der *H. pylori*-Adhäsion an die Wirtszelle

durch einen multifaktoralen Bindungsmechanismus, in dem noch weitere Adhäsine eine Rolle spielen.

Rekombinantes, humanes HSP60 aus *E. coli* zeigte keine apoptotische Wirkung in AGS-Zellen. Ein Grund hierfür könnten die Serumkomponenten (10 % FCS) sein, die die HSP60-Wirkung blockierten. Auch Vabulas et al. (2001) vermuteten, daß das FCS im Kulturmedium den Kontakt von HSP60 mit den Zellen unterbindet.

Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die genetische Varianz zwischen *H.p.*-HSP60 und rekombinant humanem HSP60 aus *E. coli* zu groß ist. Daher kann das rekombinante HSP60 schlechter als das keimeigene HSP60 an die Magenepithelzellen binden.

Eine weitere Möglich wäre, daß noch weitere Faktoren, wie das akzessorische HSP10 und ATP für die HSP60-vermittelte Apoptose von Bedeutung sind. Dafür spräche auch die Tatasche, daß einzelne Proteinfractionen, die aus der Elektroelution gewonnen wurden, nicht in der Lage waren, in den Magenepithelzellen den Zelltod zu induzieren. Allerdings muß auch davon ausgegangen werden, daß durch die Gelelektrophorese Proteine eine Änderung in ihrer Konformation erfahren und somit nicht mehr aktiv sind.

4.6 ATPasen

ATPasen gehören zu einer großen Gruppe von Enzymen, die energieabhängige Vorgänge katalysieren, bei denen ATP zu ADP und Phosphat (Pi) hydrolysiert wird.

Hitzeschockproteine z. B. benötigen ATP, um andere Proteine bei deren Faltung zu unterstützen. Die Faltung und der Transport von Proteinen sind jedoch nicht die einzigen Funktionen, die ATPasen ausführen. ATPasen unterstützen auch den aktiven Transport von Ionen und kleinen Molekülen über eine Membran gegen ein Konzentrationsgefälle. Die Na^+/K^+ -Pumpe transportiert z. B. Na^+ gegen seinen steilen elektrochemischen Gradienten durch die Hydrolyse von ATP aus einer Zelle hinaus und K^+ hinein. Das beim Transport beteiligte Enzym, die Na^+/K^+ -ATPase, benötigt zur optimalen Funktion Na^+ und K^+ . Ein weiteres Beispiel sind die Belegzellen der Magenschleimhaut, die HCl sezernieren. Die Sekretion von H^+ verläuft über die Beteiligung einer H^+/K^+ -ATPase, einem elektroneutralen Antiporter, dessen Eigenschaften denen der Na^+/K^+ -ATPase ähneln.

Die Charakterisierung der bakteriellen ATPase in der vorliegenden Arbeit ergab, daß das Enzym K^+ -abhängig war. Durch Zugabe von 10 mM Kalium konnte die Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle mehr als verfünffacht werden. Dagegen konnten andere einwertige Ionen wie Natrium und Ammonium die ATPase-Aktivität nur um den Faktor zwei erhöhen. Durch die Koinkubation des aufgereinigten *H. p.*-Sonikats mit K^+ und 100 μM bzw. 10 μM der ATPase-Hemmstoffe Ouabain und Schering 28080 wurde dessen ATPase-Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit Kalium allein um ca. 50 % gehemmt. Die Inkubation mit beiden ATPase-Inhibitoren äußerte sich allerdings nicht in einer weiteren Reduktion der ATPase-Aktivität.

Dieser Befund ist insofern ungewöhnlich, da Schering 28080 ein spezifischer H^+/K^+ -ATPase-Inhibitor ist, der auch als Säuresekretionshemmer zur Behandlung von Gastriden eingesetzt wird (Beil et al., 1986), und Ouabain, ein Na^+/K^+ -ATPase-Inhibitor, zu der Gruppe der herzaktiven Glycoside zählt, die die Stärke der Herzmuskelkontraktion erhöhen. H^+/K^+ -ATPasen sind im allgemeinen nicht durch Ouabain und Na^+/K^+ -ATPasen nicht durch Schering 28080 hemmbar.

Bis zu diesem Zeitpunkt sind keine natürlichen ATPasen bekannt, die durch beide Substanzen hemmbar sind.

Es gibt allerdings Arbeitsgruppen, die durch die Konstruktion von chimären ATPasen eine Sensitivität gegenüber beiden ATPase-Inhibitoren erzielen konnten. Asano et al. (1999) zeigten, daß durch den Austausch von 12 Aminosäuren in bestimmten Segmenten der H^+/K^+ -ATPase durch Aminosäuren, die in der Na^+/K^+ -ATPase für die Ouabain-Sensitivität verantwortlich sind, eine Hemmung der H^+/K^+ -ATPase durch 5 mM Ouabain möglich war. Die Sensitivität gegenüber Schering (50 μM) blieb dabei erhalten. Dies läßt den Schluß zu, daß die Bindungsstellen für Ouabain und Schering 28080 verschieden sind. Da die Ouabain-Sensitivität jedoch relativ gering im Vergleich zur Wild-Typ Na^+/K^+ -ATPase war, schlossen Asano et al. weitere Aminosäuren in der Ouabain-Bindung nicht aus.

Farley et al. (2001) dagegen konstruierten eine Na^+/K^+ -Chimäre durch den Austausch von 26 Aminosäuren (Gln⁹⁰⁵-Val⁹³⁰), die in der H^+/K^+ -ATPase für die Schering 28080-Sensitivität maßgeblich beteiligt sein sollen und konnten auch eine Hemmung der Aktivität ihrer Chimäre durch den Einsatz beider ATPase-Inhibitoren in gleicher Konzentration nachweisen.

Bei der *H. pylori*-ATPase muß es sich daher um eine natürliche Chimäre handeln, da sie durch beide ATPase-Hemmstoffe inhibierbar war. Warum die Hemmung der ATPase-

Aktivität nicht vollständig und der Effekt durch den Einsatz zweier ATPase-Hemmstoffe nicht additiv war, konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden.

Da in Röntgenstrukturanalysen gezeigt wurde, daß der N-Terminus des HSP60-Moleküls eine ATPase-Domäne enthält, sollte nun in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die ATPase-Untereinheit des HSP60 in der Apoptoseinduktion in Magenepithelzellen involviert war. Daher wurden AGS-Zellen mit dem aufgereinigten *Helicobacter pylori*-Sonikat und den ATPase-Inhibitoren Schering 28080 und Ouabain inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, daß der keimausgelöste programmierte Zelltod in den Magenepithelzellen durch die Koinkubation mit den ATPase-Hemmstoffen signifikant inhibiert werden konnte. Ouabain reduzierte das Ausmaß der Apoptose vollständig, während Schering 28080 die Apoptoserate um 70 % in Vergleich zum Sonikat inhibierte.

Es kann somit davon ausgegangen werden, daß die ATPase-Untereinheit des HSP60 in der *Helicobacter pylori*-induzierten Apoptose und somit auch in der Pathogenese der Ulkuserkrankungen eine wichtige Rolle spielt.

4.7 Rezeptoren für Hitzeschockprotein HSP60

HSP60 muß aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit als ein wichtiger Faktor in der Apoptoseinduktion angesehen werden. Die Rezeptoren, an die das Hitzeschockprotein bindet und den programmierten Zelltod auslöst, sind bislang noch nicht identifiziert.

Nach Huesca et al. (1996) verläuft die Adhärenz von *Helicobacter pylori* an die Magenmukosa in vitro über die spezifische Bindung an die Glycolipide Gangliotetraosylceramid (Gg4), Gangliotriaosylceramid (Gg3), Sulfogalactosylceramid (SGC) und dem Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE). Als für die Bindung verantwortlichen Faktoren wurden bakterielle Hitzeschockproteine diskutiert, da die Koinkubation mit einen gegen HSPs gerichteten Antikörper die Adhäsion des Keims an die Magenepithelzelle hemmte.

Huesca et al. (1993) zeigten, daß die Adhäsion von *H. pylori* an die Magenschleimhaut hauptsächlich über die Lipidrezeptoren PE und Gg4 verläuft, da die Bindung des Keims an Epithelzellen, die ein Defizit an PE hatten, signifikant reduziert war. PE wird daher als ein wichtiger Rezeptor für keimeigene Hitzeschockproteine angesehen. Diese Bindung, die über

die N-terminalen ATPase-enthaltenden Domäne vermittelt wird, konnte durch die Koinkubation mit Tween bis zu 80 % gehemmt werden. Auch nach Hartmann et al. (2001) war die verantwortlich Binding-Site von HSPs an die Lipidrezeptoren in der N-terminalen ATPase-enthaltenden Domäne lokalisiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose durch die Koinkubation mit 0,01 % Dextransulfat und Tween im Vergleich zum Sonikat um bis zu 120 % gehemmt werden. Es ist daher möglich, daß die Detergenzien den programmierten Zelltod inhibieren, indem sie die Adhärenz von *Helicobacter*-HSP60 an AGS-Magenepithelzellen durch die Wechselwirkung von Gruppen mit hoher negativer Ladung mit Molekülen der Zellmembran unterbinden. Auch Kamisago et al. (1996) demonstrierten, daß sulfatierte Glykokonjugate mit negativen Ladungen, wie Heparin und Mucin die Adhäsion von *H. pylori* an KatoIII-Zellen signifikant inhibierten.

Allerdings ist die Dextransulfat-, bzw. Tween-induzierte Apoptose-Hemmung relativ unspezifisch, da auch die Adhärenz anderer evtl. apoptoserelevanter Faktoren an Magenepithelzellen inhibiert wird.

Toll-like Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Erkennung von pathogenen Faktoren. Im Moment sind 10 Mitglieder der TLR-Familie identifiziert, es ist jedoch nur wenig über deren Liganden bekannt. TLR-4, der unter anderem auch in Endothelzellen und Magenepithelzellen exprimiert wird, wurde als ein Rezeptor für bakterielle Lipopolysaccharide identifiziert.

Verschiedene Autoren demonstrierten, daß auch HSP60 an TLR-4 bindet und somit entzündliche Prozesse induziert. Humanes HSP60 in einer Konzentration von 10 µg/ml stimulierte die TNF- α -Produktion in Macrophagen (Ueki et al.; 2002). Antikörper gegen CD14 und TLR-4 inhibierten signifikant die TNF- α -Produktion um bis zu 80 %. Auch die Behandlung des HSP60 mit Hitze (100 °C für 20 min) und 0,25 % Trypsin bei 37 °C für 30 min hemmte die TNF- α -Produktion um 96 % bzw. um 47 %.

Domek et al. (2001) demonstrierten, daß die *Helicobacter pylori*-induzierte Apoptose in Kato III-Zellen von einer erhöhten SAPK/JNK-Aktivität begleitet ist. Nach Ramunas et al. (2001) aktiviert sowohl bakterielles, exogenes HSP60, als auch humanes, endogenes HSP60 in Macrophagen die streßaktivierten Proteinkinasen p38 und JNK1/2, die mitogen-aktivierte Proteinkinase ERK1/2 und die I κ B-Kinase IKK. Die Aktivierung der JNK und der IKK verläuft über den Toll/IL-1-rezeptorvermittelten Signalweg, in den auch das Adaptermolekül

MyD88 und TRAF6 involviert sind. Dabei repräsentieren TLR-2 und ein Komplex aus TLR-4 und MD-2 einen potentiellen Rezeptor für HSP60. Diese Beobachtungen lassen die Deutung zu, daß die Bindung von HSP60 an den TLR-4 und die Involvierung der SAPK/JNK-Signalkaskade in der Induktion der Apoptose eine Rolle spielen.

Nach Bulut et al. (2002) aktivierte rekombinantes HSP60 konzentrationsabhängig in humanen vaskulären Endothelzellen, die den TLR-4 exprimierten, die NF- κ B- und die IL-8-Produktion, die im Rahmen eines Entzündungsprozeß eine wichtige Rolle spielen und häufig im Zusammenhang mit Apoptose diskutiert werden (Mahida et al. 1996; Lim et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Der inflammatorische Effekt des HSP60 war durch Hitze und den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers gegen HSP60 inhibierbar. Außerdem konnte in dominant negativen TLR-4-Konstrukten keine HSP60-induzierte Aktivierung der NF- κ B-Produktion festgestellt werden. Auch ein dominant negatives MyD88-Konstrukt inhibierte die HSP60-induzierte NF- κ B-Aktivierung. MyD88 stellt ein entscheidendes intrazelluläres Adapterprotein für TL-Rezeptoren dar, das Sequenzhomologien zur DD aufweist und somit die Bindung eines extrazellulären Liganden mit der Apoptosemaschinerie in der Zelle verknüpft (Aliprantis et al., 2000). Die Rekrutierung von FADD an die DD von MyD88 hat die Aktivierung der Caspase 8 zur Folge.

Habich et al. (2002) dagegen kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, daß der CD14-TLR-4-Rezeptorkomplex an der HSP60-vermittelten Signaltransduktion, nicht aber an der Bindung des Hitzeschockproteins beteiligt ist. Bindungsstudien mit TLR-4-defizienten Macrophagen und Kontrollzellen mit TLR-4 zeigten eine ähnliche Bindungsintensität für HSP60, die Zytokinproduktion jedoch unterblieb bei den TLR-4-defizienten Zellen. Für die Bindung soll ein noch nicht genauer definierter, spezifischer Rezeptor verantwortlich sein. Somit wird vermutet, daß der Rezeptorkomplex für HSP60 mindestens zwei verschiedene Komponenten für die Bindung und die Signalweiterleitung enthält.

Mit dem Sulfoglycolipidrezeptor und dem TLR-4 sind zwei mögliche Rezeptortypen für HSP60 identifiziert worden. Inwieweit diese für die direkte HSP60-vermittelte Apoptoseinduktion in AGS-Zellen verantwortlich ist, muß in Folgestudien geklärt werden.

4.8 Sphingomyelinasen

Neben den Phospholipasen A und C, die unter den *Helicobacter pylori*-Enzymen als pathogene Faktoren identifiziert wurden, da sie eine schädigende Wirkung auf die

Phospholipidschicht der Magenmukosa besitzen (Langton et al., 1992; Weitkamp et al., 1993), stehen keimeigene Sphingomyelinasen im Verdacht, eine Rolle in der Pathogenese der Ulkuserkrankungen zu spielen.

SMasen katalysieren die Hydrolyse von Sphingomyelin, einem Phospholipid, das an der äußeren Plasmamembran lokalisiert ist, zu Cholinphosphatderivaten und Ceramiden. Letztere diffundieren durch die Zellmembran und werden als wichtige Mediatoren (second messenger) in der Signaltransduktion, der Regulation des Zell-Wachstums, der Differenzierung, des Zelltods und der Immunantwort diskutiert (Okazaki et al., 1989; Hannun et al., 1994). Eine Vielzahl extrazellulärer Stimuli, wie Fas, TNF- α , IL-1 β , NGF, chemotherapeutische Agenzien und Serumdeprivation, die als Induktoren der Apoptose bekannt sind, aktivieren die SMasen und erhöhen somit den intrazellulären Ceramid-Level (Wiegmann et al., 1994; Zhang et al., 1996; Jayadev et al., 1995). Da Ceramide Kinase-Kaskaden und Transkriptionsfaktoren, die am programmierten Zelltod beteiligt sind, aktivieren, könnten *Helicobacter pylori*-SMasen an der Apoptose-Induktion in Magenepithelzellen beteiligt sein.

Bislang sind zwei Klassen von Sphingomyelinasen bekannt: Mg^{2+} -abhängige, membrangebundene, neutrale SMasen und Mg^{2+} -unabhängige, cytosolische, saure SMasen. Die Enzyme hydrolysieren hauptsächlich Sphingomyelin und Phosphatidylethanolamin (Chan et al.; 2000).

Nach Jarvis (1994) induzierte die Inkubation von Zellen mit synthetischen Ceramiden oder Sphingomyelinasen den programmierten Zelltod. Es gibt Hinweise, daß eine wachsende Anzahl an Zelloberflächenrezeptoren Signale generieren, die die Hydrolyse von Sphingomyelin zu zellgängigen Ceramiden katalysieren (Testi; 1996). Crosslinking von CD95-sensitiven Zellen mit DX2, einem Anti-CD95-Antikörper, resultiert in der Aktivierung einer sauren Sphingomyelinase und der Entstehung von Ceramiden aus Sphingomyelin (Cifone, 1994). Auch die Interaktion von TNF mit seinem Rezeptor initiiert die Hydrolyse von Sphingomyelin durch SMasen.

Die cytoplasmatische Domäne des TNF-Rezeptors enthält zwei Regionen, die mit der sauren und der neutralen Sphingomyelinase assoziiert sind. NSD (NSMase activating domain) ist über das Adapter-Protein FAN (factor activating NSMase) mit der neutralen SMase verknüpft (Adam-Klages et al., 1996). Die zweite cytoplasmatische Region namens DD (death domain), die einerseits nach der Ligandenbindung durch direkte Interaktion mit dem Adaptermolekül FADD Caspasen aktiviert und somit Apoptose induziert, ist über noch nicht genauer bekannte Strukturen mit der sauren SMase verknüpft, die ihrerseits zur Generierung von Ceramiden

und der folgenden Aktivierung der SAPK/JNK-Signalkaskade zur Caspase-3 Aktivierung und somit zur Apoptose führt.

Nach Birbes et al. (2001) translozieren saure SMasen zur Mitochondrienmembran, generieren dort durch ihre katalytische Aktivität Ceramide, induzieren eine Cytochrom *c*-Freisetzung und folgend den programmierten Zelltod. Durch die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 kann dieser Prozeß verhindert werden. Auch Peptid-Inhibitoren für Caspase 8 (z-IETD-fmk) inhibieren die Aktivierung der sauren SMase und somit den Zelltod (Sawada et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden neutrale und saure Sphingomyelinasen aus *Helicobacter pylori* isoliert und auf deren Apoptose induzierende Wirkung untersucht. Allerdings waren die isolierten Enzyme nicht in der Lage, in AGS-Magenepithelzellen den programmierten Zelltod auszulösen.

Ein Grund dafür könnte allerdings der zu saure pH-Wert des Glycinpuffers (2,2), der nach Lin et al. zur Extraktion von Membran-SMasen benutzt wurde, sein, da pH-Wert-abhängige Tests in dieser Arbeit schon eine Verminderung in der Apoptose-Aktivität des Keims bei pH 4 zeigten. Dagegen war ab 2 Units einer käuflich erworbenen SMase eine 2fache Erhöhung der DNA-Fragmentierung zu verzeichnen. Weiterführende Untersuchungen sollten daher zeigen, ob eine Ceramidproduktion in Magenepithelzellen nach Zugabe von *H. pylori* induziert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, daß durch die Koinkubation von AGS-Magenepithelzellen mit dem aufgereinigten *H. p.*-Sonikat und 10 µM des Ca²⁺-Kanalblockers Nifedipin die keiminduzierte Apoptose um 79 % bzw. 45 % im Vergleich zu 40 µg bzw. 80 µg Sonikat gehemmt werden konnte.

Auch SR33557, ein L-Typ Ca²⁺-Kanalblocker, ein Inhibitor der sauren, nicht aber der neutralen SMase, inhibiert die Bildung von Ceramiden und somit den Fas- und TNF-α-induzierten Zelltod (Sawada et al., 2002).

Da die Veränderung von intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln in der Apoptoseinduktion diskutiert wird, wurden weitere Ca²⁺-Antagonisten wie TMB8 und LaCl₃ auf ihre Wirkung untersucht. Die Inkubation der AGS-Zellen mit Sonikat und TMB8 bzw. LaCl₃ resultierte jedoch in keiner Verminderung der *H. p.*-ausgelösten DNA-Fragmentierung.

Die Hemmung der *H. p.*-induzierten Apoptose durch Nifedipin muß daher auf anderen Mechanismen als auf der Veränderung von intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln beruhen. Es ist

daher möglich, daß Nifedipin den keiminduzierten Zelltod durch die Hemmung der bakteriellen Sphingomyelinase inhibiert.

Da in der Sequenzanalyse der im Apoptoseprozeß relevanten Proteinbanden jedoch keine SMasen identifiziert wurden, besteht die Möglichkeit, daß durch die Bindung von weiteren Liganden an ihre Zelloberflächenrezeptoren Signale generiert werden können, die die Hydrolyse von Sphingomyelin zu zellgängigen Ceramiden katalysieren. Phosphatidylethanolamin z. B. ist ein potentieller Rezeptor für das Hitzeschockprotein HSP60. Durch die Bindung von HSP60 könnte PE hydrolysiert werden und so durch die Entstehung von Ceramiden zur Apoptose führen. Somit wäre ein weiterer Weg aufgezeigt, auf dem das HSP60 seine apoptoseauslösende Wirkung ausüben könnte.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Involvierung des Hitzeschockproteins HSP60 aus *Helicobacter pylori* in der direkten Apoptoseinduktion nachgewiesen. Inwieweit das HSP60 alleinig für die Induktion des programmierten Zelltods verantwortlich ist, sollte in weiteren Nachforschungen ermittelt werden.

Besonderes Interesse gilt hier der genaueren Untersuchung der Rezeptoren, über die das *Helicobacter pylori*-Hitzeschockprotein HSP60 Apoptose in Magenepithelzellen induziert. Die Verwendung von HSP60-Negativmutanten könnte weiteren Aufschluß über die Bedeutung des Hitzeschockproteins in der Apoptoseinduktion geben.

5 Zusammenfassung

Die Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Ulkuserkrankungen. Eine 24-stündige Inkubation mit dem Keim geht mit einem 2- bis 3fach erhöhten programmierten Zelltod in der verwendeten AGS-Magenepithelzelllinie einher. Die zugrundeliegenden Faktoren werden jedoch kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene Faktoren, die in der *H. pylori*-induzierten Apoptose eine Rolle spielen, untersucht. Die Involvierung des Vac- und Cag-Status in der Induktion des programmierten Zelltods wurde durch die Verwendung von Negativmutanten ausgeschlossen. Auch bakterielle Lipopolysaccharide waren nicht an der Apoptoseauslösung beteiligt. Die *H. pylori*-Urease war in der Lage, das Ausmaß der Apoptose in Magenepithelzellen zu erhöhen, kann allerdings nicht als alleiniger Faktor angesehen werden.

Mittels proteinchemischer Aufreinigungsmethoden, die Ammoniumsulfat- und Hitzefällung sowie flüssigkeitschromatographische Aufreinigungen über Hydroxylapatit und hydrophobe Interaktion umfaßten, konnte in der gelelektrophoretischen Auftrennung apoptotisch aktiver Fraktionen eine Proteinbande bei 60 kDa angereichert werden, die in sequenzanalytischen Untersuchungen als das Hitzeschockprotein HSP60 identifiziert wurde. Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers konnte die HSP60-induzierte Apoptose um bis zu 60 % inhibiert werden. Die Hemmung des programmierten Zelltods wurde durch Messung der DNA-Fragmentierung im Histon-Elisa nachgewiesen.

Die ATPase-Aktivität des aufgereinigten *H. pylori*-Sonikats, die in enzymatischen Messungen durch einwertige Kationen in der Reihenfolge $\text{NH}_4^+ = \text{Na}^+ \ll \text{K}^+$ stimulierbar war, wurde durch die selektiven Na^+/K^+ - und H^+/K^+ -Inhibitoren Ouabain und Schering 28080 um 50 % gehemmt. Es mußte sich daher um eine chimäre ATPase handeln, die durch beide ATPase-Hemmstoffe inhibierbar war.

Da in Röntgenstrukturanalysen gezeigt wurde, daß das N-terminale Fragment des HSP60-Moleküls eine ATPase-Domäne enthält, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob der keimausgelöste programmierte Zelltod in den Magenepithelzellen durch die Koinkubation mit ATPase-Inhibitoren hemmbar war. Ouabain reduzierte das Ausmaß der Apoptose vollständig, während Schering 28080 die Apoptoserate um 70 % in Vergleich zum Sonikat inhibierte. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß die ATPase-Untereinheit des HSP60 in der *Helicobacter pylori*-induzierten Apoptose beteiligt ist.

Einen für die HSP60-Bindung und -Signalweiterleitung verantwortlichen Rezeptortypen stellen Sulfoglycolipide dar. Insbesondere Phosphatidylethanolamin könnte durch die Bindung von HSP60 hydrolysiert werden und so durch die Entstehung von zellgängigen Ceramiden über den SAPK-abhängigen Signalweg zur Caspase 3-Aktivierung und zur Apoptose führen.

6 Literaturverzeichnis

Adam-Klages, S., Adam, D., Wiegmann, K., Struve, S., Kolanus, W., Schneider-Mergener, J., Krönke, M. (1996) FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase,
Cell 86, 937-947

Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H., Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N., Matsushima, K. (1997) Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45,
Infect. Immun. 65, 3218-24

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, L. (1997) Molekularbiologie der Zelle,
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Aliprantis, AO., Yang, RB., Weiss, SD., Godowski, P., Zychlinski, A. (2000) The apoptotic signaling pathway activated by toll-like receptor-2,
EMBO J. 19, 3325-3336

Allen, L.A., (2000) Modulating phagocyte activation: the pros and cons of *Helicobacter pylori* virulence factors,
J. Exp. Med. 191, 1451-1454

Amersham Pharmacia Biotech (1999) Protein Purification Handbook

Asano, S., Matsuda, S., Hoshina, S., Sakamoto, S., Takeguchi, N. (1999) A chimeric gastric H⁺,K⁺-ATPase inhibitable with both ouabain and SCH 28080,
J. Biol. Chem. 274, 6848-6854

Atherton, J., Covacci, A. (1997) Pathogenic properties of *Helicobacter pylori*,
Curr. Op. Gastroenterol. 13, 20-24

Baik, S., Youn, H., Chung, M., Lee, W., Cho, M., Ko, G., Park, C., Kasai, H., Rhee, K. (1996) Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa,
Cancer Res. 56, 1279-1282

Banerjee, S., Hawksby, C., Miller, S. (1994) Effect of *Helicobacter pylori* and its eradication on gastric juice ascorbic acid,
Gut. 35, 317-322

Bauerfeind, P., Garner, RM., Mobley, LT. (1996) Allelic exchange mutagenesis of *nixA* in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity,
Infect. Immun. 64, 2877-80

Beil, W., Hackbarth, I., Sewing, KF. (1986) Mechanism of gastric antisecretory effect of SCH 28080,
Br. J. Pharmacol. 88, 19-23

Beil, W., Enss, M.L., Müller, S., Obst, B., Sewing, K., Wagner, S. (2000) Role of *vacA* and *cagA* in *Helicobacter pylori* inhibition of mucin synthesis in gastric mucous cells,
J. Clin. Microbiol. 38, 2215-2218

Birbes, H., El Bawab, S., Hannun, YA., Obeid, LM. (2001) Selective hydolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis,
FASEB J. 15, 2669-79

Borgoyne, LA., Hewisch, DR., Mobbs, J. (1974) Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis,
Biochem. J. 143, 67-72

Born, W., Happ, MP., Dallas, A., Reardon, C., Kubo, R., Shinnick, T., Brennan, P., O'Brien, R. (1990) Recognition of heat shock proteins and gamma delta cell function,
Immunol. Today 11, 40-3

Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D., Green, D. (1998) Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarisation,
EMBO 17, 37-49

Budihardjo, I., Holt, O., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis,
Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 15, 269-290

Bukanov, N., Berg, DE. (1994) Ordered cosmid library and high-resolution physical genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638,
Mol. Microbiol. 11, 509-523

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, KS., Equils, O., Morrison, SG., Morrison, RP., Arditi, M. (2002) Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through toll-like recetor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway,
J. Immunol. 168, 1435-1440

Cario, E., Rosenberg, IM., Brandwein, SL., Beck, PL., Reinecker, HC., Podolsky, DK. (2000) Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors,
J. Immunol. 164, 966-72

Carson, DA., Ribeiro, JM. (1993) Apoptosis and disease,
Lancet. 341, 1251-4

Carter, SG., Karl, DW. (1982) Inorganic phosphate assay with malachite green: an improvement and evaluation,
J. Biochem. Biophys. Methods 7, 7-13

Cellini, L., Allocati, N., Angelucci, D., Lezzi, T., Di Campli, E., Marzio, L., Dinelli, B. (1994) Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice,
Microbiol. Immunol. 38, 843-850

Chan, EC., Chang, CC., Li, YS., Chang, CA., Chiou, CC., Wu, TZ. (2000) Purification and characterisation of neutral sphingomyelinase from *Helicobacter pylori*,
Biochemistry 39, 4838-45

Chen, G., Sordillo, E., Ramey, W., Reidy, J., Holt, P., Krajewski, S., Reed, J., Blaser, M., Moss, S. (1997) Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and is accompanied by increased expression of BAK,
Biochem. Biophys. Res. Comm. 239, 626-632

Chinnaiyan, A., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V. (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis,
Cell 81, 505-512

Cifone, MG., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, MR., Azuma, M., Lanier, LL., Santoni, A., Testi, R. (1994) Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase,
J. Exp. Med. 180, 1547-52

Cleveland, JL. and Ihle, IN. (1995) Contenders in FasL/TNF death signaling,
Cell 81, 479-82

Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N. (1993) Molecular characterisation of the 128-kD immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5791-5759

Cover, T.L., Blaser, M.J. (1992) Purification and characterisation of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*,
J. Biol. Chem. 267, 10570-10575

Cover TL, Dooley CP, Blaser MJ. (1990) Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity,

Infect. Immun. 58, 603-10

Crabtree, J., Taylor, J., Wyatt, R. (1991) Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kD protein, peptic ulceration and gastric pathology,

Lancet 338, 332-335

Crabtree, J., Farmery, S., Lindley I. (1994) CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleucine-8 in gastric epithelial cells,

J. Clin. Pathol. 47, 945-950

Crabtree, JE., Shallcross, TM., Heatley, RV., Wyatt, JI. (1991) Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis,

Gut. 32, 1473-7

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, K., Maundrell, B., Antonsson, B., Martinou, J. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome *c* release during apoptosis,

J. Cell. Biol. 144, 891-901

Domek, MJ., Netzer, P., Prins, B., Nguyen, T., Liang, D., Wyle, FA., Warner, A. (2001) *Helicobacter pylori* induces apoptosis in human epithelial gastric cells by stress activated protein kinase pathway,

Helicobacter 6, 110-115

Dunn, B.E., Roop, R.M., Sung, C., Sharama, S.A., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. (1992) Identification and purification of a cpn60 heat shock protein homolog from *Helicobacter pylori*,

Infect. Immun. 60, 1946-1951

- Dunn, BE., Campbell, GP., Perez-Perez, GI., Blaser, MJ. (1990) Purification and characterisation of urease from *Helicobacter pylori*,
J. Biol. Chem. 265, 9464-9469
- Ehlert, J., Kubbutat, M. (2001) Apoptosis and its relevance in cancer therapy,
Onkologie 24, 433-440
- Eidt, S., Stolte, M. (1993) Prevalence of lymphoid follicles and lymphoid aggregates in *Helicobacter pylori* gastritis in antral and body mucosa of the stomach,
J. Clin. Pathol. 46, 832-835
- Eskes, R., Desager, S., Antonsson, B., Martinou, L. (2000) Bid induces the oligomerisation and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane,
Mol. Cell. Biol. 20, 929-935
- Fan, X., Gunasena, H., Chen, Z., Espejo, R., Crowe, SE., Ernst, PB., Reyes, VE. (2000) *Helicobacter pylori* Urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis,
J. Immunol. 165, 1918-1924
- Fan, X., Crowe, SE., Behar, S., Gunasena, H., Ye, G., Haeberle, H., Van Houten, N., Gourley, WK., Ernst, PB., Reyes, VE. (1998) The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T-helper cell type 1-mediated damage,
J. Exp. Med. 187, 1659-1669
- Farley, RA., Schreiber, S., Wang, SG., Scheiner-Bobis, G. (2000) A hybrid between Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺,K⁺-ATPase is sensitive to Palytoxin, Ouabain, and SCH 28080,
J. Biol. Chem. 276, 2608-2615
- Ferrero, R., Lee, A. (1991) The importance of urease in acid protection for the gastric colonizing bacteria *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis* sp. nov.,
Microb. Ecol. Health Dis. 4, 121-134

Figura N, Guglielmetti P, Rossolini A, Barberi A, Cusi G, Musmanno RA, Russi M, Quaranta S. (1989) Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only,
J. Clin. Microbiol. 27, 225-6

Finucane, D., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N., Cotter, T., Green, D. (1999) Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL,
J. Biol. Chem. 274, 2225-2233

Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, JC., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricci, V., Solcia, E., Van Obberghen, E., Boquet, P. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release,
EMBO J. Vol. 19, No. 23, 6361-6370

Garner, JA., Cover, TL., (1996) Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells,
Infect. Immun. 64, 4197-203

Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G. (2001) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death,
Biochem. Biophys. Res. Com. 286, 433-442

Geis, G., Leying, H., Suerbaum, S., Mai, U., Opferkuch, W. (1989) Ultrastructure and chemical analysis of *Helicobacter pylori* flagella,
J. Clin. Microbiol. 27, 436-441

Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H., Opferkuch, W. (1993) Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*,
J. Med. Microbiol. 38, 371-7

Geis, G., Lying, H., Suerbaum, S., Opferkuch, W. (1990)

Unusual fatty acid substitution in lipids and lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori*,
J. Clin. Microbiol. 28, 930-2

Gougeon, ML., Montagnier, A. (1993) Apoptosis and AIDS,
Science 260, 1269-70

Habich, C., Baumgart, K., Kolb, H., Burkart, V. (2002) The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins,
J. Immunol. 168, 569-576

Hale, A., Smith, C., Sutherland, L., Stoneman, V., Longthorne, V., Culhane, A., Williams, G. (1996) Apoptosis: molecular regulation of death,
Eur. J. Biochem. 236, 1-26

Hall, PA., Coates, PJ., Ansari, A., Hopwood, D. (1994) Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract; the importance of apoptosis,
J. Cell. Sci. 107, 3569-3577

Halliwell, B., Aruoma, O. (1991) DNA damage by oxygen derived species, its mechanism and measurement in mammalian systems,
FEBS Let. 281, 156-160

Hannun, YA. (1994) The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide,
J. Biol. Chem. 269, 3125-8

Hartmann, E., Lingwood, CA., Reidl, J. (2001) Heat-inducible surface stress protein (Hsp70) mediates sulfatide recognition of the respiratory pathogen *Haemophilus influenzae*,
Infect. Immun. 69, 3438-3441

- Hauke, C., Grabner W., Grosse, M., Stolte, M. (1990) Zur Frage nach der Lymphfolikelbildung und der Entstehung der intestinalen Metaplasie in der Antrumschleimhaut als eine Reaktion auf eine *Helicobacter pylori*-Besiedlung,
Leber Magen Darm 4, 156-160
- Hayashi, H., Tatebe, H., Osaki, M., Goto, A., Suzuki, Y., Ito, H. (1997) Expression of Fas antigen and its mediation of apoptosis in human gastric cancer cell lines,
Jpn. J. Cancer Res. 88, 49-55
- Hazell, S., Evans, D., Graham, D. (1991) *Helicobacter pylori* catalase,
J. Gen. Microbiol. 137, 57-61
- Hazell, S., Lee, A., Brady, L., Hennessy, W. (1986) *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium,
J. Infect. Dis. 153, 658-663
- Hongbin, Z., Reed, J. (1997) Heterodimerisation-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells,
J. Biol. Chem. 272, 31482-31488
- Houghton, J., Korah, M., Condon, M., Kim, K. (1999) Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway,
Dig. Dis. Sci. 44, 465-478
- Huesca, M., Gold. B., Sherman, P., Lewin, P., Lingwood, CA. (1993) Therapeutics used to alleviate peptic ulcers inhibit *H. pylori* receptor binding in vitro,
Zentralbl. Bakteriол. 280, 244-52
- Huesca, M., Borgia, S., Hoffman, P., Lingwood, CA. (1996) Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacter pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock (stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonisation,
Infect. Immun. 64, 2643-2648

- Huesca, M., Goodwin, A., Bhagwansingh, A., Hoffman, P., Lingwood, CA. (1998) Characterisation of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesion, from *Helicobacter pylori*,
Infect. Immun. 66, 4061-4067
- Igarashi, M., Kitada, Y., Yoshiyama, H., Takagi, A., Miwa, T., Koga, Y. (2001) Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection,
Infect. Immun. 69, 816-821
- Imawati, B., Holt, O., Lutter, M., Xu, L., Xiaodong, W. (1999) Chemical pathways of caspase activation during apoptosis,
Cell Dev. Biol. 15, 269-90
- Jang, TJ., Kim, JR. (2000) Alteration of cellular turnover in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa,
J. Gastroenterol. 35, 312-314
- Jarvis, WD., Kolesnick, RN., Fornari, FA., Traylor, RS., Gewirtz, DA., Grant, S. (1994) Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway,
Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 73-77
- Jayadev, S., Liu, B., Bielawska, AE., Lee, JY., Nazaire, F., Pushkareva, MY., Obeid, LM., Hannun, YA. (1995) Role for ceramide in cell cycle arrest,
J. Biol. Chem. 270, 2047-52
- Jefferies, C., O'Neil, LAJ. (2002) Signal transduction pathway activated by toll-like receptors,
Mod. Asp. Immunobiol. 2, 169-175
- Jones, N., Day, A., Jennings, H., Sherman, P. (1999) *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression,
Infect. Immun. 67, 4237-4242

- Jones, N., Sherman, P. (1999) *Helicobacter pylori*-epithelial cell interactions: from adhesion to apoptosis,
Can. J. Gastroenterol. 13, 563-566
- Kamisago, S., Iwamori, M., Tai, T., Mitamura, K., Yazaki, Y., Sugano, K. (1996) Role of sulfatides in adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells,
Infect. Immun. 64, 624-628
- Kansau, I., Guillain, F., Thiberge, JM., Labigne, A. (1996) Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA),
Mol. Microbiol. 22, 1013-23
- Kansau, I., Labigne, A. (1996) Heat shock proteins of *Helicobacter pylori*,
Aliment. Pharmacol. Ther. 10 Suppl 1, 51-6
- Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Sugiyama, T., Kawai, T., Nikawa, T., Kishi, K., Rokutan, K. (2001) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide from type I, but not type II strains, stimulates apoptosis of cultured gastric mucosal cells,
J. Med. Invest. 48, 167-174
- Kawahara, T., Teshima, S., Kuwano, Y., Oka, A., Kishi, K., Rokutan, K. (2001) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells,
Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G 726-G 734
- Kawahara, Y., Yokota, K., Mizuno, M., Yunoki, N., Uesu, T., Okada, H., Kobayashi, K., Hirai, Y., Oguma, K., Tsuji, T. (1999) Antibodies to human gastric epithelial cells and heat shock protein 60 in *Helicobacter pylori* positive mucosa associated lymphoid tissue lymphoma,
Gut 45, 20-3
- Kiang, JG., Tsokos, GC. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology,
Pharmacol. Ther. 80, 183-201

Kim, JM., Kim, JS., Jung, H., Song, I., Kim, C. (2000) Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor α and soluble fas ligands, *Scand. J. Gastroenterol.* 35, 40-48

Kim, JM., Kim, JS., Jung, H., Song, I., Kim, C. (2000) Virulence factors of *Helicobacter pylori* in Korean isolates do not influence proinflammatory cytokine gene expression and apoptosis in human gastric epithelial cells, nor do these factors influence the clinical outcome, *J. Gastroenterol.* 35, 898-906

Kluck, R., Bossy-Wetzel, E., Green, D., Newmeyer, D. (1997) The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* 275, 1132-1136

Kluck, R., Degli Esposti, M., Perkins, G., Renken, C., Kuwana, T., Bossy-Wetzel, E., Goldberg, M., Allen, T., Barber, M., Green, D., Newmeyer, D. (1999) The proapoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilisation of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol, *J. Cell Biol.* 147, 809-822

Knipp, U., Birkholz, S., Kaup, W., Opferkuch, W. (1996) Partial characterisation of a proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*, *Infect. Immun.* 64, 3491-3496

Koenderink, JB., Hermsen, HP., Swarts, HG., Willems, PH., De Pont, JJ. (2000) High-affinity ouabain binding by a chimeric H⁺,K⁺-ATPase containing transmembrane hairpins M3-M4 and M5-M6 of the alpha 1-subunit of rat Na⁺,K⁺-ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11209-14

Kohda, K., Tanaka, K., Aiba, Y., Yasuda, M., Miwa, T., Koga, Y. (1999) Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer, *Gut.* 44, 456-62

Konturek, P., Pierzchalski, P., Konturek, S., Meixner, H., Faller, G., Kirchner, T., Hahn, E. (1999) *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans,
Scand. J. Gastroenterol. 34,375-383

Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S. (1997) Mitochondrial control of apoptosis,
Immunol. Today 18, 44-51

Kuck, D., Kolmerer, B., Ikng-Konert, C., Krammer, PH., Stremmel, W., Rudi, J. (2001) Vacuolating Cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS,
Infect. Immun. 69, 5080-5087

Kurosawa, A., Miwa, H., Hirose, M., Tsune, I., Nagahara, A., Sato, N. (2002) Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by *Helicobacter pylori* through increased phosphorylated p53, p21 and Bax expression in endothelial cells,
J. Med. Microbiol. 51, 385-91

Kuwana, T., Smith, J., Muzio, M., Dixit, V., Newmeyer, D., Kornbluth, S. (1998) Apoptosis induction by caspase-8 is amplified through the mitochondrial release of cytochrome c,
J. Biol. Chem. 273, 16589-16594

Langton, SR., Cesareo, SD. (1992) *Helicobacter pylori* associated phospholipase A2 activity: a factor in peptic ulcer production?,
J. Clin. Pathol. 45, 221-4

Le'Negrate, G., Ricci, V., Hofman, V., Mograbi, B., Hofman, P., Rossi, B (2001) Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the cag pathogenicity island phenotype,
Infect. Immun. 69 (8), 5001-5009

Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. (1988) Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*,
J. Med. Microbiol. 26, 93-9

- Leying, H., Suerbaum, S., Geis, G., Haas, R. (1992) Cloning and genetic characterisation of a *Helicobacter pylori* flagellin gene,
Mol. Microbiol. 6, 2863-2874
- Lim, JW., Kim, H., Kim, H. (2001) NF-kappaB, inducible nitric oxide synthase and apoptosis by *Helicobacter pylori* infection,
Free Radic. Biol. Med. 31 (3), 355-66
- Lin, Y., Liu, J., Chen, K., Chen, C., Chan, E. (1998) Identification of neutral and acidic sphingomyelinases in *Helicobacter pylori*,
FEBS Let. 423, 249-253
- Liu, X., Slaughter, C., Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis,
Cell 89, 175-184
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998) Bioanalytik,
Spektrum Verlag, Heidelberg
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors,
Cell 94, 481-490
- Lynch, D., Mapstone, N., Clarke, A. (1995) Cell proliferation in the gastric corpus in *Helicobacter pylori* associated gastritis and after gastric resection,
Gut. 36, 351-353
- Macchia, G., Massone, A., Burrone, D., Covacci, A., Censini, S., Rappuoli, R. (1993) The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases,
Mol. Microbiol. 9, 645-652

- Mahida, YR., Makh, S., Hyde, S., Gray, T., Boriello, SP. (1996) Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleucin 8 production and apoptosis after cell detachment,
Gut 38, 337-347
- Malfertheiner, P. (1996) *Helicobacter pylori* – Von der Grundlage zur Therapie,
Thieme Verlag, Stuttgart New York
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S., Beutner, G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins,
J. Exp. Med. 187, 1261-1271
- Masamune, A., Shimosegawa, T., Masamune, O., Mukaida, N., Koizumi, M., Toyota, T. (1999) *Helicobacter pylori*-dependent ceramide production may mediate increased interleukin 8 expression in human gastric cancer cell lines,
Gastroenterology 116, 1330-41
- Massari, P., Manetti, R., Burroni, D., Nuti, S., Norais, N., Rappuoli, R., Telford, JL. (1998) Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells,
Infect Immun. 66, 3981-4
- Mobley, HL., Cortesia, MJ., Rosenthal, LE., Jones, BD. (1988) Characterisation of urease from *Helicobacter pylori*,
J. Clin. Microbiol. 26, 831-6
- Mobley, HL., Island, MD., Hausinger, RP. (1995) Molecular biology of microbial ureases,
Microbiol. Rev. 59, 451-480
- Moran, A. (1995) Cell surface characteristics of *Helicobacter pylori*,
FEMS Immunol. Med. Microbiol 10, 271-280

Moss, S., Calam, J., Agarwal, B., Wang, S., Holt, P. (1996) Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*,
Gut. 38, 498-501

Moss, S., Sordillo, E., Abdalla, A., Makarov, V., Hanzely, Z., Perez-Perez, G., Blaser, M., Holt, P. (2001) Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonisation with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains,
Cancer Res. 61, 1406-1411

Munzenmaier, A., Lange, C., Glocker, E., Covacci, E., Moran, A., Bereswill, S., Baeuerle, PA., Kist, M., Pahl, HL. (1997) A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B,
J. Immunol. 159, 6140-6147

Negrini R, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Gullini S, Villanacci V, Poiesi C, Albertini A, Ghielmi S. (1991) *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa,
Gastroenterology 101, 437-45

Le'Negrate, G., Ricci, V., Hofman, V., Mograbi, B., Hofman, P., Rossi, B (2001) Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the *cag* pathogenicity island phenotype,
Infect. Immun. 69 (8), 5001-5009

Newell, MK., Vanderwall, J., Beard, KS., Freed, JH. (1993) Ligation of major histocompatibility complex class II molecules mediates apoptotic cell death in resting B lymphocytes,
Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 10459-63

Nishida, E., Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways,
Trends Biochem. Sci. 18, 123-130

Obst, B., Wagner, S., Sewing, K.F., Beil, W. (2000) *Helicobacter pylori* causes DNA damage in gastric epithelial cells,
Carcinogenesis 21, 1111-1115

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., Kolb, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex,
J. Immunol. 164, 558-561

Okazaki, T., Bell, RM., Hannun, YA.(1989) Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. role in cell differentiation,
J. Biol. Chem. 264, 19076-80

Papini, E., Bernard, M., Milia, E., Bugnoli, M., Zerial, M., Rappuoli, R., Montecucco, C. (1994) Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9720-9724

Papini, E., Zoratti, M., Cover, TL. (2001) In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action,
Toxicon 39, 1757-1767

Peek, RM. Jr, Blaser, MJ., Mays, DJ., Forsyth, MH., Cover, TL., Song, SY., Krishna, U., Pietenpol, JA. (1999) *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle,
Cancer Res. 59, 6124-31

Pena, LA., Fuks, Z., Kolesnik, R. (1997) Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway,
Biochem. Pharmacol. 53, 615-621

Piotrowski, J., Skrodzka, D., Slomiany, A., Slomiany, BL. (1996) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces gastric epithelial cell apoptosis,
Biochem. Mol. Biol. Int. 40, 597-602

Reed, J. (2000) Mechanism of apoptosis,
Am. J. Pathol. 157, 1415-1430

Rokkas, T., Ladas, S., Liatsos, C., Petridou, E., Papatheodorou, G., Theocharis, S., Karameris, A., Raptis, S. (1999) Relationship of *Helicobacter pylori* cagA status to gastric cell proliferation and apoptosis,
Dig. Dis. Sci. 44, 487-493

Rudi, J., Kuck, D., Strand, S., von Herbay, S., Mariani, S., Krammer, P., Galle, P., Stremmel, W. (1998) Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis,
J. Clin. Invest. 102, 1506-1514

Ruiz-Bustos, E., Ochoa, J.L., Wadstrom, T., Ascencio, F. (2001) Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan,
J. Med. Microbiol. 50, 215-222

Salvesen, G.S., Dixit, M.V. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis,
Cell 91, 443-446

Samli, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P., Orrenius, S. (1999) Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells,
EMBO J. 18, 2040-8

Sawada, M., Nakashima, S., Kiyono, T., Yamada, J., Hara, S., Nakagawa, M., Shinoda, J., Sakai, N. (2002) Acid sphingomyelinase activation requires caspase-8 but not p53 nor reactive oxygen species during Fas-induced apoptosis in human glioma cells,
Exp. Cell. Res. 273, 157-68

Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S., Krammer, P., Peter, M. (1998) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells,
J. Biol. Chem. 273, 22532-22538

Schägger, H., Jagow, G. (1994) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complex in enzymatically active form,
Analyt. Biochem. 199, 223-231

Schamel, WAW., Schamel, KR. (2001) Die blaue native Gelelektrophorese zur Untersuchung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen,
Immunologie Aktuell 2, 33-39

Scholl, PR., Geha, RS. (1994) MHC class II signaling in B-cell activation,
Immunol. Today. 15, 418-22

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., Peter, M.E. (1994) Apoptosis signaling by death receptors,
Eur. J. Biochem. 254, 439-459

Schulze-Osthoff K, Krammer PH, Droge W. (1994) Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death,
EMBO J. 13, 4587-96

Segal, E., Falkow, L., Tomkins, L. (1996) *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangement and tyrosine phosphorylation of host cell proteins,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1259-164

Slomiany, BL., Piotrowski, J., Slomiany, A. (1998) Induction of caspase-3 and nitric oxide synthase-2 during gastric mucosal inflammatory reaction to *Helicobacter pylori* polysaccharide,
Biochem. Mol. Biol. Int. 46, 1063-1070

Slomiany, BL., Slomiany, A. (2002) Disruption in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide involves ERK and p38 mitogen-activated protein kinase participation,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 294 220-4

Smoot, D. (1997) How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms,
Gastroenterology 113, 31-34

- Smoot, D., Mobley, H., Chippendale, G., Levinson, J., Resau, J. (1990) *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells,
Infect. Immun. 58, 1992-1994
- Spiegelhalder, C., Gerstenecker, A., Kersten, E. (1993) Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene,
Infect. Immun. 61, 5315-5325
- Steininger, H., Faller, G., Dewald, E., Brabletz, T., Jung, A., Kirchner, T. (1998) Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies,
Virchows. Arch. 433, 13-18
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. (2000) Apoptosis signaling,
Annu. Rev. Biochem. 69, 217-245
- Szabo, I., Tarnawski, AS. (2000) Apoptosis in the gastric mucosa: molecular mechanisms, basic and clinical implications,
J. Physiol. Pharmacol. 51, 3-15
- Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, JL., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., Zoratti, M. (1999) Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity,
EMBO J. 18, 5517-27
- Tanahashi, T., Kita, M., Kodama, T., Yamaoka, Y., Sawai, N., Ohno, T., Mitsufuji, S., Wei, YP., Kashima, K., Imanishi, J. (2000) Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells,
Infect. Immun. 68, 664-71
- Taylor, D., Blaser, M. (1991) The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection,
Epidemiol. Rev. 13, 42-59

Testi, R. (1996) Sphingomyelin breakdown and cell fate,
Trends Biochem. Sci. 21, 468-71

Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Nagano, K., Ito, T., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T., Tamura, K. (1992) Ammonia: a possible promotor in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis,
Cancer Lett. 65, 15-8

Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Fusamoto, H., Kamada, T., Sato, N. (1992) Mechanism of gastric mucosal damage induced by ammonia,
Gastroenterology 102, 1881-8

Tufano, M., Rossano, F., Catalanotti, P., Liguori, G., Capasso, C., Ceccarelli, MT. (1994) Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins,
Infect. Immun. 2, 1392-1399

Ueki, K., Tabeta, H., Yamazaki, Y., Yamazaki, K. (2002) Self-heat shock protein 60 induces tumor necrosis factor- α in monocyte-derived macrophage: possible role in chronic inflammatory periodontal disease,
Clin. Exp. Immunol. 127, 72-77

Vabulas, RM., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, CJ., Häcker, H., Wagner, H. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleucin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells,
J. Biol. Chem. 276, 31332-31339

von Ahnsen, O., Renken, C., Perkins, G., Kluck, R., Wetsel, E., Newmeyer, D. (2000) Preservation of mitochondrial structure and function after Bid-or Bax-mediated cytochrome *c* release,
J. Cell Biol. 150, 1027-1036

Wagener, C. (1996) Einführung in die molekulare Onkologie,
Thieme Verlag, Stuttgart New York

Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R., Bock, C., Trautwein, C., Bleck, J., Manns, M. (1997) Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis,
Gastroenterology 113, 1836-1874

Wang, J., Fan, X., Lindholm, C., Bennett, M., O' Connoll, J., Shanahan, F., Brooks, E., Reyes, V., Ernst, P. (2000) *Helicobacter pylori* modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas-ligand interactions,
Infect. Immun. 68, 4303-4311

Watanabe, S., Takagi, A., Koga, Y., Kamiya, S., Miwa, T. (2000) *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells through inducible nitric oxide,
J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 168-174

Weitkamp, JH., Perez-Perez, GI., Bode, G., Malfertheiner, P., Blaser, MJ. (1993) Identification and characterization of *Helicobacter pylori* phospholipase C activity,
Zentralbl. Bakteriol. 280, 11-27

Wiegmann, K., Schutze, S., Machleidt, T., Witte, D., Kronke, M. (1994) Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling,
Cell. 78, 1005-15

Williams, C., Preston, M., Hossak, C. (1996) *Helicobacter pylori* utilises urea for amino acid synthesis,
FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13, 87-94

Wyllie, AH., Kerr, JF., Currie, AR. (1980) Cell death: the significance of apoptosis,
Int. Rev. Cytol. 68, 251-306

Xanathoudakis, S., Roy, S., Rasper, D., Hennessey, T., Aubin, Y., Cassady, R., Tawa, P., Ruel, R., Rosen, A., Nicholson, DW. (1999) Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis,
EMBO J. 18, 2049-56

Xanathoudakis, S., Nicholson, DW. (2000) Heat shock proteins as death determinants,
Nature Cell Biology, Vol. 2, 163-165

Xia, HH., Talley, NJ. (2001) Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis,
Am. J. Gastroenterol. 96, 16-26

Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P., Telford, J., Figura, N., Rappuoli, R., Covacci, A. (1995) Analysis of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin,
Infect. Immun. 63, 94-98

Yamaguchi, H., Osaki, T., Kurihara, N., Kitajima, M., Kai, M., Takahashi, M., Taguchi, H., Kamiya, S. (1999) Induction of secretion of interleucine-8 from human gastric epithelial cells by heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*,
J. Med. Microbiol. 48, 927-33

Yamaguchi, H., Osaki, T., Kurihara, N., Taguchi, H., Hanawa, T., Yamamoto, T., Kamiya, S. (1997) Heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells,
J. Med. Microbiol. 48, 825-31

Yamaguchi, H., Osaki, T., Taguchi, H., Hanawa, T., Yamamoto, T., Kamiya, S. (1996) Flow cytometric analysis of the heat-shock protein 60 expressed on the cell surface of *Helicobacter pylori*,
J. Med. Microbiol. 45, 270-277

Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C., Ibrado, A., Cai, J., Peng, T., Jones, D., Wang, X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked,
Science 275, 1129-1132

Yokota, K., Hirai, Y., Haque, M., Hayashi, S., Isogai, H., Sugiyama, T., Nagamachi, E., Tsukada, Y., Fujii, N., Oguma, K. (1994) Heat shock protein produced by *Helicobacter pylori*,

Microbiol. Immunol. 38, 403-405

Young DB. (1990) Chaperonins and the immune response,

Semin. Cell. Biol. 1, 27-35

Zhang, J., Alter, N., Reed, JC., Borner, C., Obeid, LM., Hannun, YA. (1996) Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death,

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93, 5325-8

Zarrilli, R., Ricci, V., Romano, M. (1999) Molecular response of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori*-induced cell damage,

Cellular Microbiology 1 (2), 93-99

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet und die zur Hilfsleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Diese Arbeit wurde nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Außerdem erkläre ich, daß diese Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Arbeit verwendet wurde.

Silke Schütz

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Silke Schütz
Anschrift:	Göttinger Chaussee 102 30459 Hannover Tel.: 0511 / 411386 E-Mail: Silke.Schuetz@web.de
Geboren am:	13. 03. 1973 in Bad Oeynhausen
Familienstand:	ledig
Eltern:	Horst Schütz Rowitha Schütz geb. Kühl

Schulbildung

1979 – 1982:	Grundschule Obernbeck
1982 – 1989:	Städt. Gymnasium Löhne
1989 – 1992:	Friedrichs-Gymnasium Herford

Berufsausbildung

1992 – 1995:	Ausbildung zur Chemielaborantin Universität Bielefeld
--------------	--

Hochschulstudium

1995 – 2000:	Studium der Biochemie
Mündliche Diplomprüfung:	Mai 2000 mit der Note „sehr gut“ bestanden
Diplomarbeit:	von Juni 2000 bis November 2000 am Institut für allgemeine Pharmakologie mit dem Titel „Einfluß der Proteinkinase C auf die durch <i>Helicobacter pylori</i> induzierte Apoptose in Magenepithelzellen.“ Mit der Note „sehr gut“ bewertet.
Anfertigung der Dissertation:	seit Januar 2001 im Institut für allgemeine Pharmakologie unter der Anleitung von Prof. Dr. med. W. Beil.

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Winfried Beil für die Ausgabe der Dissertationsarbeit sowie für die intensive Betreuung und die vielfältigen Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller danke ich für die Übernahme des Referats.

Bei Frau Petra Kilian, Frau Ute Staar möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bei der Laborarbeit und das tolle Arbeitsklima bedanken.

Herrn Dr. Harald John danke ich für die freundlich Übernahme der Sequenzanalysen.

Meinen Eltern, die mich jederzeit unterstützt und beraten haben, möchte ich besonders danken.